

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEMANGI (*Occimum cannum* Sims) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDE (MDA) SERUM DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TRAKEA PADA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA YANG DIINDUKSI OVALBUMIN DAN LIPOPOLISAKARIDA



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEMANGI (*Ocimum cannum* Sim) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDE (MDA) SERUM DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TRAKEA PADA TIKUS (*Ratus Norvegicus*) MODEL ASMA YANG DIINDUKSI OVALBUMIN DAN LIPOPOLISAKARIDA

Oleh :
DEDI HARTAWAN
NIM. 135130107111033

Setelah dipertahankan di depan majelis penguji pada
tanggal 10 Juli 2018 dan dinyatakan memenuhi
syarat untuk memperoleh gelar sarjana
Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Pembimbing 2

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 195204121980021001

drh. Ajeng Erika P. H., M.S.i
NIP. 198905162015042001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dedi Hartawan
NIM : 135130107111033
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul :

Efek Pemberian Ekstrak Kemangi (*Ocimum cannum* Sims) Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Serum Dan Gambaran Histopatologi Trakea Pada Tikus Putih (*Ratus Norvegicus*) Model Asma Yang Diinduksi Ovalbumin Dan Lipopolisakarida

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Juli 2018

Yang menyatakan,

(Dedi Hartwan)

NIM. 135130107111033

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KEMANGI (*Occimum cannum* Sims)
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDE (MDA) SERUM
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TRAKEA PADA
TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA
YANG DIINDUKSI OVALBUMIN DAN
LIPOPOLISAKARIDA**

ABSTRAK

Asma merupakan penyakit yang diakibatkan inflamasi kronis pada saluran pernafasan. Angka prevalensi asma pada anjing dan kucing mencapai sekitar 1-5% dari jumlah populasi seluruh dunia. Ekstrak Kemangi (*Occimum cannum* Sims) berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi yang dapat menurunkan radikal bebas. Penurunan radikal bebas ditunjukkan oleh kadar MDA serum dan gambaran histopatologi trakea. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak kemangi sebagai terapi asma pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma. Kadar MDA diukur dengan metode *Thiobarbaturic Acid* (TBA) dan pembuatan histopatologi trakea menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Penelitian ini dilakukan menggunakan hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kontrol negatif (sehat), kelompok positif (diberikan OVA dan LPS tanpa terapi), tiga kelompok terapi (diberikan OVA dan LPS serta terapi ekstrak kemangi dosis bertingkat 0,6; 0,9; dan 1,2 g/kg BB). Analisis kuantitatif kadar MDA diuji dengan *One Way* (ANOVA), uji tukey, dan deskriptif untuk pengamatan histopatologi trakea. Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian terapi ekstrak kemangi mampu menurunkan kadar MDA serum dan dapat memperbaiki epitel trakea pada tikus putih model asma ($P < 0,01$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak kemangi dapat digunakan sebagai terapi herbal pada tikus putih model asma berdasarkan penurunan kadar MDA serum dan perbaikan gambaran histopatologi trakea dengan dosis optimum, yaitu 1,2 g/kg BB.

Kata Kunci : Asma, Ekstrak Kemangi, MDA, dan Histopatologi Trakea

Effects Of Basil (*Occimum cannum Sims*) Extract on Serum Malondialdehyde (MDA) And Tracheal Histopathology in Rats (*Rattus norvegicus*) Asthma Model Of Ovalbumin Induction and Lipopolysaccharide

Abstract

Asthma is a disease caused by chronic inflammation of the respiratory tract. The prevalence rate of asthma in dogs and cats reaches about 1-5% of the total population worldwide. Basil (*Occimum cannum Sims*) extract acts as an antioxidant and anti-inflammatory that can decrease free radicals. Free radical decline is indicated by serum MDA levels and trachea histopathologic features. This study aims to determine the potential of basil extract as an asthma therapy in white rats (*Rattus norvegicus*) model of asthma. MDA levels were measured by Thiobarbaturic Acid (TBA) and tracheal histopathology using Hematoxylin Eosin (HE) staining. This study was conducted using animal models of rats (*Rattus norvegicus*) were divided into five groups: negative control (healthy), positive group (given OVA and LPS without treatment), three treatment groups (OVA and LPS are given as well as the therapeutic dose graded basil extract 0.6; 0.9; and 1.2 g / kg BW). Quantitative analysis of MDA levels was tested with One Way (ANOVA), tukey test, and descriptive for tracheal histopathology observation. The results of this study showed giving that basil extract therapy was able to decrease serum MDA level and can improve tracheal epithelium in rat of asthma model ($P < 0.01$). The conclusion of this study are giving basil extract can be used as an herbal treatment in the rat model of asthma by decreased levels of serum MDA and improvement of histopathology trachea with optimum dose of 1,2 g / kg BW.

Keywords: Asthma, Basil Extract, MDA, and Trachea Histopathology

KATA PENGANTAR

Ucapan Puji Syukur penulis haturkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul ” **Efek Pemberian Ekstrak Kemangi (*Ocimum cannum* Sims) Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Serum dan Gambaran Histopatologi Trakea Pada Tikus putih (*Rattus novergicus*) Model Asma Yang Diinduksi Ovalbumin dan Lipopolisakarida**” dengan lancar.

Dalam penyusunan Skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS., selaku dosen pembimbing 1 atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas serta waktu yang telah diberikan selama ini.
2. drh. Ajeng Erika P. H., M. Si., selaku dosen pembimbing 2 atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas serta waktu yang telah diberikan selama ini.
3. drh. Aulia Firmawati, M.Vet., selaku dosen penguji 1 yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun
4. drh. Rahadi Swastomo, M. Biomed., selaku dosen penguji 2 yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun.
5. Seluruh jajaran dekanat, dosen dan staf fakultas Kedokteran Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya (FKH UB) atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
6. Ayahanda Swarna, Ibunda Rinase, Milanim dan saudara saya yang tercinta Niken Arimi untuk doa, kasih sayang dukungan, serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
7. Teman-teman kontrakan yang tidak dapat saya sebutkan satu satu atas dukungan dan motivasi yang diberikan.

8. Teman-teman seperjuangan keluarga besar angkatan 2013 FKH UB, khususnya kelas C atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi- mimpi yang luar biasa.
9. Teman-teman kelompok skripsi “Kemangi” Danik, Itan, Aisyah, Bima yang berjuang agar penelitian ini dan berhasil dan bermanfaat bagi masyarakat.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin

Malang, 10 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Batasan Masalah.....	5
1.4 Tujuan Penelitian.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 7
2.1 Asma.....	7
2.2 Ovalbumin	10
2.3 Lipopolisakarida	12
2.4 Malodialdehide (MDA) Serum Pada Kondisi Asma.....	13
2.5 Histopatologi Trakea	14
2.6 Kemangi(<i>Occimum Cannum Sims</i>).....	18
2.7 Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Model Asma.....	21
 BAB 3 METODE KEGIATAN	 23
3.1 Kerangka Teori	23
3.2 Kerangka Konsep	26
3.3 Hipotesis Penelitian	26
 BAB 4 METODE PENELITIAN	 28
4.1 Tempat dan Waktu Kegiatan	28
4.2 Bahan dan Alat Penelitian	28
4.2.1 Bahan Penelitian.....	28

4.2.2 Alat Penelitian	28
4.3 Sampel Penelitian	29
4.4 Rancangan Penelitian	29
4.1 Variabel Penelitian	31
4.6 Tahapan Penelitian	31
4.6.1 Preparasi Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>)	31
4.6.2 Hewan Model Asma	32
4.6.3 Pembuatan Ekstrak Kemangi (<i>Occimum Cannum Sims</i>)	32
4.6.4 Pemberian Terapi Ekstrak Kemangi (<i>Occimum Cannum Sims</i>)	33
4.6.5 Pengambilan Sampel Serum	33
4.6.6 Penentuan Larutan Kurva Baku Standar Malondialdehyde (MDA) ...	34
4.6.7 Pengukuran Kurva Baku Malondialdehyde (MDA) Serum	34
4.6.8 Pengambilan Trakea	35
4.6.9 Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histologi Trakea	35
4.7 Analisis Data	38
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	39
5.1 Efek Terapi Ekstrak Kemangi (<i>Occimum cannum Sims</i>) Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Serum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Asma Induksi Ovalbumin Dan Lipopolisakarida	39
5.2 Efek Terapi Ekstrak Kemangi (<i>Occimum cannum Sims</i>) Terhadap Gambaran Histopatologi Trakea Induksi Ovalbumin dan Lipopolisakarida	44
BAB 6 KESIMPULAN	52
6.1 Kesimpulan	52
6.2 Saran	52
DAFTAR PUSATAKA	53
LAMPIRAN	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	30
5.1 Rata-Kata Kadar (MDA), Standar Deviasisi dan Hasil Uji Tukey pada Serum Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)s	40

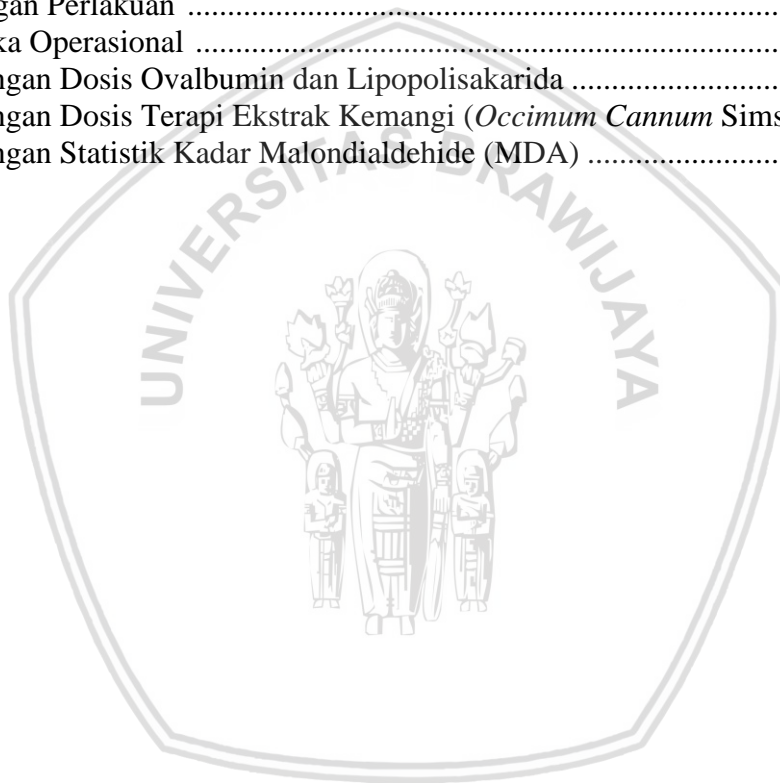


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Patomekanisme Imunologi Asma	8
2.2 Sturktur Anatomi Trakea	15
2.3 Trakea Dengan Potongan Melintang Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE).....	16
2.4 Dinding Trakea Sectional Pewaranaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE).....	17
2.5 Epitel Pseudotrafied Kolumnner Bersilia Pada Trakea Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE)	17
2.6 Histologi dan Histopatologi Trakea	18
2.7 Struktur Dasar Flvonoid.....	19
2.8 Kemangi (<i>Occimum cannum</i> Sims)	20
3.1 Kerangka Teori.....	23
3.2 Kerangka Konsep.....	26
5.2 Gambaran Histopatologi Trakea Setelah Diterapi Ekstrak Kemangi (<i>Occimum cannum</i> Sims)	46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik	61
2. Pembuatan Ekstrak Kemangi (<i>Occimum Cannum Sims</i>).....	62
3. Rancangan Perlakuan	62
4. Kerangka Operasional	64
5. Perhitungan Dosis Ovalbumin dan Lipopolisakarida	65
6. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Kemangi (<i>Occimum Cannum Sims</i>) ...	67
7. Perhitungan Statistik Kadar Malondialdehyde (MDA)	68



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

µg	: Mikrogram
µL	: Mikroliter
%	: Persen
Al(OH) ₃	: Aluminium Hidroksida
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
ANOVA	: <i>One way Analysis of Variance</i>
BB	: Berat Badan
CD	: Cluster of Differentiation
COX	: Siklooksigenase
Cm	: Centimeter
HE	: Hematoksin-Eosin
IgE	: <i>Immunoglobulin E</i>
IL	: Interleukin
Kd	: Kilodalton
Kg	: Kilogram
LBP	: <i>Lipopolisaccharide Binding Protein</i>
LPS	: Lipopolisakarida
MDA	: Malondialdehid
Mm	: Milimeter
mg	: Miligram
MHC	: <i>Major Histocompatibility</i>
mL	: Mililiter
NaCl	: <i>Sodium Chloride</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor –Kappa Beta</i>
OVA	: Ovalbumin
PBS	: Phosphat Buffer saline
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TBA	: <i>Thiobarbituric Acid</i>
SPSS	: <i>Statistical Package Social Science</i>
Sel B	: Sel Beta
TCA	: Tricarboxylic Acid
TH ₂	: T helper-2
TH ₁	: T helper-1
TLR-4	: Toll Like Receptor-4
TNF-α	: Tumor Necrosis Factor α

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asma merupakan penyakit kronik pada saluran pernafasan yang mengakibatkan penyempitan saluran pernafas, banyak ditemukan pada manusia dan hewan. Asma pada hewan terutama pada kucing dapat dijumpai pada semua usia (*Foster et al.*, 2004). Asma merupakan penyakit inflamasi kronik, dimana banyak sel yang berperan antara lain sel mast, eosinofil, limfosit T, makrofag, neutrofil, dan sel epitel. Gejala asma sering ditandai dengan episodik berulang berupa batuk, sesak nafas, *wheezing* (mengi), dan rasa berat di dada. Adapun penyebab terjadi asma dikarenakan alergen, virus, dan iritan, yang dapat menginduksi respon inflamasi. Faktor lain yang mempengaruhi asma adalah faktor genetik, asap rokok, polusi udara (Rengganis, 2008).

Kejadian asma banyak dijumpai pada kucing dan anjing yang dapat menyerang pada semua umur. Prevalensi asma pada kucing sekitar 1-5% dari jumlah populasi seluruh dunia (Carey, 2011). Gejala asma ditandai dengan obstruksi saluran pernafasan, inflamasi kronis saluran pernafasan, hiperresponsivitas, hipersekresi mukus, dan deskuamasi epitel pada saluran pernafasan (Busse dkk., 2001). Prevalensi asma yang tinggi pada kucing terjadi karena adanya kombinasi penyebab antara faktor genetik dan paparan alergen dari lingkungan (Reinero, 2013).

Asma pada hewan dipengaruhi oleh banyak faktor, infeksi rongga mulut yang telah diketahui mampu menyebabkan keadaan asma pada anjing. Penelitian yang

dilakukan di Amerika menunjukkan bahwa 20-50% pasien asma yang meninggal diakibatkan oleh infeksi sekunder pada rongga mulut yang dapat memperparah gejala asma (Smits, 2009). Terdapat banyak bakteri Gram negatif yang bersifat anaerob pada plak gigi hewan yang dapat menyebabkan infeksi rongga mulut dan memperparah gejala asma. *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri patogen penyebab infeksi rongga mulut. Lipopolisakarida pada *Porphyromonas gingivalis* merupakan endotoksin yang dapat menstimulasi respon sel-sel mediator inflamasi (Darveau *et al.*, 2002).

Lipopolisakarida yang diinduksi secara intrasulkular pada daerah gingivalis merupakan faktor resiko yang memperparah keadaan asma. Menurut Schwartz, (2002) dan Utomo, (2006) mengatakan bahwa bakteri *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri rongga mulut yang menyebabkan adanya plak gigi dan periodontitis merupakan faktor resiko yang menyebabkan keparahan asma. Infeksi lipopolisakarida akan menyebabkan kerusakan organ pernafasan dan menginduksi produksi dan pelepasan sel inflamatori, seperti eosinofil, neutrofil, monosit, makrofag, dan sitokin. Sel-sel inflamasi yang teraktivasi akibat inflamasi menghasilkan oksidan reaktif, seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mampu menghasilkan senyawa radikal bebas dan enzim proteolitik. Radikal bebas mampu menyebabkan peroksidasi lipid pada membran biologis, sehingga menyebabkan kerusakan membran biologis. Peroksidasi lipid merupakan proses oksidasi asam lipid tidak jenuh berantai panjang (*Polyunsaturated fatty acids* atau PUFA) pada membran sel yang menghasilkan produk aldehida, seperti MDA (Sharma *et al.*, 2003). Perhitungan kadar MDA

merupakan salah satu parameter penting untuk menentukan peroksida lipid dan kerusakan oksidatif yang terjadi pada sel. Kerusakan sel epitel pada saluran pernafasan dapat menjadi indikasi tingkat keparahan asma (Wadsworth *et al.*, 2012).

Ovalbumin (OVA) merupakan protein utama putih telur sebagai bahan sensitasi respon imun kearah Th2 untuk mengaktifkan sel B menjadi sel B plasma, sehingga menghasilkan Ig E. Ig E akan berikatan dengan sel mast sehingga menyebabkan degranulasi dari sel mast dan menghasilkan mediator inflamasi seperti histamin, sitokin, prostaglandin dan leukotrin (Kumar *et al.*, 2008). Produk dari mediator inflamasi akan menyebabkan inflamasi, sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada saluran pernafasan.

Mengingat prevalensi asma yang semakin meningkat, maka pengobatan asma terus dikembangkan. Pengobatan menggunakan obat-obatan kimiawi memiliki efek samping yang beragam, seperti mual, muntah, hingga hipertensi. Oleh karena itu, perlu dicarikan alternatif pengobatan asma dengan bahan alam, salah satu kemangi (*Occimum Cannum Sims*). Menurut Kharisma (2002) kemangi banyak mengandung vitamin C, saponin, flavonoid, dan tannin. Flavonoid yang terkandung pada kemangi berperan sebagai antioksidan yang dapat menurunkan radikal bebas yang bermanfaat bagi kesehatan (Agustina dan Ahmad, 2003). Senyawa fitokimia yang terkandung dalam ekstrak kemangi (*Occimum Cannum Sims*) menunjukkan ada senyawa golongan flavonoid, saponin, dan tannin memiliki efek antiinflamsi. Mekanisme flavonoid dalam menghambat proses inflamsi, yaitu menghambat aktivitas enzim sikloginase dan lipooksiginse secara langsung, sehingga menyebabkan penghambat

biosintesis eicosanoid dan leukotrin (Hidayati, 2008; Sukaina, 2013). Mekanisme antiinflamasi saponin dengan menghambat pembentukan eksudat dan menghambat kenaikan permeabilitas vaskuler. Tanin diketahui mempunyai aktifitas antiinflamasi, astringen, antidiare, diuretik, dan antiseptic (Fitriyani *et al.*, 2011). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) dapat digunakan sebagai kandidat terapi asma yang mampu menurunkan peroksida lipid, sehingga kadar MDA akan turun serta memperbaiki kerusakan Gambaran histopatologi trakea.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah di uraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut :

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) terhadap penurunan kadar MDA Serum tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma induksi ovalbumin dan lipopolisakarida?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) terhadap perbaikan gambaran histopatologi trakea tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma induksi ovalbumin dan Lipopolisakarida?

1.3 Batasan Masalah

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), Jantan, strain *Wistar* yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya, usia 8-12 minggu, dan berat 150-200 gram.
2. Keadaan asma pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan dengan cara injeksi ovalbumin secara interperitoneal 10µg/ekor dan inhalasi 1 mg/ekor, serta diperparah dengan menggunakan injeksi lipopolisakarida dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara intrasulkuler dengan dosis 1µg/ekor (Utomo, 2012).
3. Kemangi yang dipakai berasal dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya adalah bagian daun kemangi yang dikeringkan, selanjutnya di ekstraksi dengan menggunakan etanol 70% (Dera, 2004).
4. Terapi pemberian ekstrak kemangi (*Occimum Cannum Sims*) diberikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dimulai pada hari ke-22, diberikan terapi peroral dengan dosis 0,6 g/Kg BB; 0,9 g/Kg BB; dan 1,2 g/Kg BB.
5. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah Kadar MDA) Serum dengan metode uji TBA dan gambaran histopatologi trakea dengan pewarnaan HE, diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kemangi (*Occimum cannum Sims*) terhadap penurunan kadar MDA Serum tikus putih (*Occimum cannum Sims*) model asma iduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kemangi (*Occimum cannum Sims*) terhadap perbaikan gambaran histopatologi trakea tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma induksi ovalbumin dan lipopolisakrida.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat memberikan informasi tentang pemanfaatan ekstrak kemangi (*Occimum cannum Sims*) sebagai kandidat terapi asma.

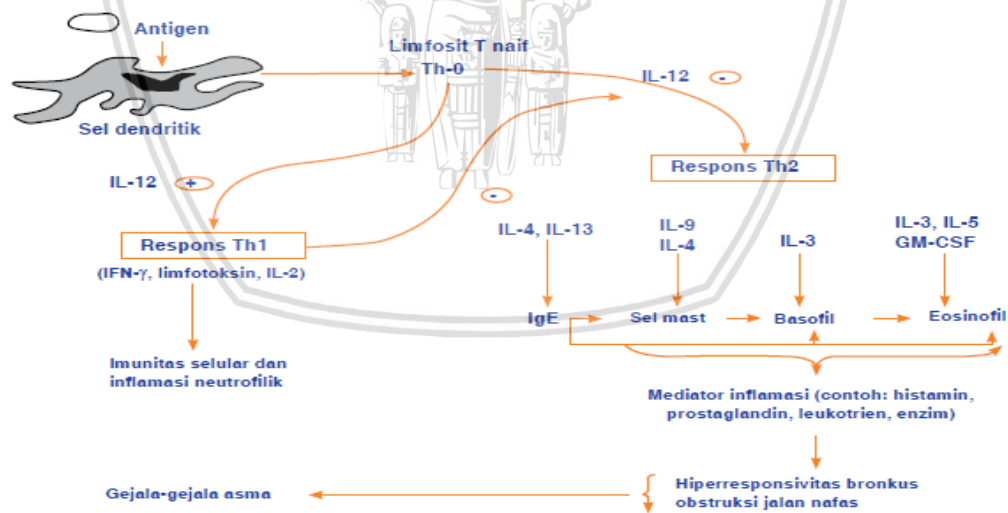
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asma

Asma merupakan penyakit saluran napas yang ditandai oleh penyempitan bronkus, yaitu kepekaan saluran napas terhadap berbagai rangsangan. Manifestasi dari asma adalah penyempitan saluran napas dengan berbagai gejala mulai dari batuk-batuk, rasa berat di dada, bunyi mengi, dan sesak napas. Gejala ini timbul biasanya bila ada faktor pencetus yang merangsang saluran napas. Penyakit asma mengenai semua umur, tetapi banyak ditemukan pada anak-anak dan dewasa muda (Graha, 2008).

Menurut *Lewis et al.*, (2007) asma adalah gangguan inflamasi kronik pada saluran pernafasan. Inflamasi kronik ini dapat menyebabkan peningkatan hiperresponsif saluran pernafasan yang ditandai dengan sulit bernafas, dada terasa berat (dada sesak), dan batuk. Menurut NHLBI (2007), asma merupakan penyakit inflamasi kronik saluran nafas dimana banyak sel yang berperan terutama sel mast, eosinophil, limfosit T, makrofag, neutrofil, dan sel epitel. Pada individu proses inflamasi tersebut menyebabkan *wheezing* berulang, sesak nafas. Inflamasi juga menyebabkan peningkatan hiperresponsif saluran nafas. Hiperresponsif saluran nafas terjadi karena kontraksi otot polos bronkial yang menyebabkan penyempitan saluran pernafasan kearah luar (Ignatavicius and Workman 2010). Serangan Asma dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain virus, alergen, dan iritan yang menginduksi respon inflamasi. Asma ditandai dengan obstruksi saluran pernafasan,

hiperesponsivitas, edema dinding saluran pernafasan, infiltrasi sel inflamasi serta *remodeling* dari saluran pernafasan. Inflamasi saluran pernafasan pada asma merupakan proses yang sangat kompleks, melibatkan faktor genetik, antigen, berbagai sel inflamasi, interaksi antar sel dan mediator yang membentuk proses inflamasi kronik dan *remodeling* (Sundaru, 2007). Menurut Barnes *et al.*, (2011), mengatakan bahwa pelepasan mediator inflamasi juga mengakibatkan perubahan struktur dalam saluran pernafasan, misalnya fibrosis yang dihasilkan dari deposisi kolagen. Proses inflamasi asma khas ditandai dengan peningkatan eosinophil, sel mast, makrofag serta limfosit-T di lumen dan mukosa saluran pernafasan. Proses patomekanisme asma secara umum tertera pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1. Patomekanisme Imunologi Asma (Barnes *et al.*, 2011).

Paparan alergen yang masuk kedalam tubuh akan dikenali dan dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC). Hasil dari presentasi tersebut mengaktifkan sel T

yang kemudian terjadi polarisasi sel Th2. Sel Th2 akan melepaskan respon yang dapat merangsang pelepasan berbagai sitokin oleh sel efektor. Sel TH2 selanjutnya diteruskan ke sel limfosit B untuk menghasilkan IgE. Sitokin proinflamasi seperti IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-16, dan *granulocyte-monocyte colony stimulating factor* (GM-CSF) dihasilkan oleh sel Th2. Kemudian akan terjadi pengerahan sel mast, eosinofil, makrofag, neutrofil dan basofil ke daerah inflamasi. Mediator inflamasi yang dilepaskan adalah histamin, prostaglandin, leukotrien dan enzim (Barnes *et al.*, 2011). Sel-sel inflamasi ini dapat menghasilkan mediator-mediator inflamasi yang sangat banyak seperti kemokin, sitokin, dan leukotrien yang berpengaruh baik secara langsung terhadap saluran pernafasan maupun secara tidak langsung melalui mekanisme neural, peningkatan inflamasi saluran pernafasan kronik setelah paparan alergen berulang. Hasilnya yaitu reaksi inflamasi kronik di saluran pernafasan yang terus-menerus mengalami cedera hingga menimbulkan perubahan struktural saluran pernafasan. Perubahan struktur ini secara keseluruhan disebut sebagai proses *remodeling* saluran pernafasan (Canonica, 2006).

Sel-sel inflamatori dan mediator inflamasi tersebut bisa menginfiltrasi dan menyumbat saluran pernafasan sehingga mengakibatkan kerusakan pada epitel dan deskuamasi pada lumen saluran pernafasan. Inflamasi yang terjadi menyebabkan saluran pernafasan menjadi hiperresponsif yaitu cenderung untuk berkonstriksi apabila terpapar oleh alergen. Pelepasan mediator inflamasi juga menyebabkan perubahan struktur dalam saluran pernafasan, misalnya fibrosis yang dihasilkan dari deposisi kolagen. Proses inflamasi saluran pernafasan pada asma mendasari gangguan

obstruksi saluran pernafasan dengan gejala khas asma berupa batuk, rasa berat di dada, dan sesak. Hiperresponsif saluran pernafasan akan merangsang terjadinya bronkokonstriksi. Lapisan otot polos pada saluran pernafasan juga menjadi lebih tebal pada penderita asma akibat hasil peningkatan jumlah sel otot polos (hiperplasia) dan peningkatan ukurannya (hipertrofi). Hipertrofi dan hiperplasia otot polos saluran pernafasan, sel goblet dan kelenjar saluran pernafasan, serta hipersekresi kelenjar mukus menyebabkan penyempitan saluran napas (Barnes *et al.*, 2011; Busse and Lemanske, 2001).

2.2 Ovalbumin

Ovalbumin merupakan suatu alergen yang digunakan dalam pembuatan hewan model asma untuk menimbulkan peradangan pada paru-paru. Ovalbumin merupakan fosfolikoprotein monomer dengan berat molekul 43-45 kD (Huntington *and* Stein, 2001). Ovalbumin dapat diperoleh dari putih telur sebanyak 45% dari total protein. Paparan kronik ovalbumin sebagai alergen akan menimbulkan perubahan struktur dan terjadi inflamasi pada saluran pernafasan (Barlianto dkk., 2009). Pemberian ovalbumin dapat meningkatkan IgE dan terjadi inflamasi dengan gejala infiltrasi sel radang dan eosinofil. Ovalbumin adalah salah satu jenis alergen berupa alergen makanan protein putih telur yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi dan menyebabkan pengeluaran immunoglobulin. Ovalbumin dapat mengaktivasi jenis-jenis leukosit yaitu basofil, eosinofil, monosit, limfosit dan neutrophil (Juwita, 2015).

Pemberian ovalbumin (OVA) dilakukan secara injeksi intraperitoneal pada hari ke-1 dan hari ke-14. Pemberian OVA pertama (hari ke-1) bertujuan sebagai pengenalan antigen terhadap respon imun (respon imun primer) sedangkan pemberian OVA kedua (hari ke-14) bertujuan agar respon imun terhadap antigen yang terjadi akan lebih cepat (respon imun sekunder). Pemaparan ovalbumin sebagai alergen akan masuk ke dalam tubuh lalu ditangkap oleh *Antigen Presenting Cell* (APC). Kemudian diproses dan dipresentasikan ke sel T $CD4^+$ atau sel Th_0 . Sel Th_0 akan berdiferensiasi menjadi $CD4^+$ Th_1 dan sel $CD4^+$ Th_2 . Kerja dua sel tersebut bersinergi, dimana sel $CD4^+$ Th_2 berperan sebagai respon imun humoral yang akan mensekresikan antibodi (IgE). Sedangkan sel $CD4^+$ Th_1 berperan dalam respon imun seluler yang akan menghasilkan sitokin pro inflamasi seperti IL-1 β , IL-2, IL-6 dan TNF α . Ovalbumin melalui sel $CD4^+$ Th_2 memicu produksi sel mast, paparan ovalbumin berikutnya akan menimbulkan degranulasi sel mast yang akan memproduksi lipid mediator (termasuk histamin) sehingga timbul alergi inflamasi pada saluran nafas yang akan bermanifestasi sebagai asma alergi (Rachmadian, 2011).

2.3 Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) merupakan dinding sel bakteri Gram negatif yang mampu memperparah keadaan asma. Lipopolisakarida yang digunakan berasal dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang memiliki ciri-ciri tidak berspora, bakteri anaerob, dan tidak memiliki alat gerak (Iman dkk., 2011). Dorlan (2005) dan Setianti

(2009) menyatakan LPS merupakan endotoksin dan antigen grup spesifik penting (antigen O) yang terdiri atas tiga bagian, yaitu lipid A, inti polisakarida, dan rantai spesifik O. Struktur lipid A bertanggung jawab terhadap reaksi dalam tubuh penderita. LPS merangsang respon imun dengan menstimulasi sitokin proinflamasi, seperti TNF, IL-1, IL-6, IL-8, *platelet activating factor*, metabolit asam arakidonat, eritropoietin dan endotelin (Giacometti *et al.*, 2002; Daniel and Remick 2007; Sumarmi dan Guntur, 2008).

Peningkatan aktivitas protease dikarenakan paparan LPS dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang direspon oleh reseptor *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) yang mampu memodulasi sistem imun untuk melepaskan protease. Lipopolisakarida dapat terikat dengan dinding sel saluran pernapasan melalui bantuan senyawa *Lipopolysaccharide-binding protein* (LBP). Lipopolisakarida tidak bertindak secara langsung terhadap sel tetapi melalui aktivasi sel inflamator dan mediator sistem imunitas (Campbell *et al.*, 2006; Kuswantoro, 2012).

Pengaruh yang signifikan paparan dari adanya LPS yang diberikan akan menginduksi respon imun melalui jalur TH-2 yang selanjutnya akan memproduksi sitokin proinflamasi diantaranya IL-4, IL-6, IL-9, IL-13. Sitokin IL-4 dan IL-13 tersebut mengaktifkan sel B, sehingga akan memproduksi s-IgE untuk mengaktifasi sel mast. Sitokin IL-6 dan IL-9 tersebut mengaktifkan sel makrofag sehingga akan memproduksi neutrofil. Sel mast, makrofag dan neutrofil yang telah teraktivasi selanjutnya akan memproduksi protease. Paparan LPS juga menyebabkan faktor

traskripsi *Nuklear factor* κ B (NF- κ B) yang mengalami migrasi menuju nukleus, untuk mengekspresikan sitokin dan kemokin seperti TNF α dan prostaglandin (Campbell *et al.*, 2006; Kuswantoro, 2012).

2.4 Malondialdehida (MDA) Serum Pada Kondisi Asma

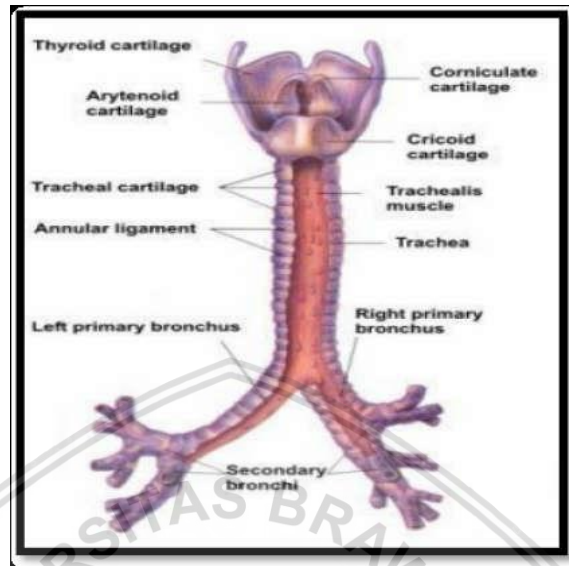
Malondialdehida (MDA) merupakan suatu radikal bebas hasil metabolit reaktif peroksidasi lipid yang umumnya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif (Shofia *et al.*, 2013). Malondialdehida (MDA) dapat dijadikan sebagai tanda untuk mengetahui stres oksidatif dalam tubuh (Winarsi, 2010). Radikal bebas MDA dibangkitkan oleh alloxan dengan adanya pembentukan radikal bebas superoksida melalui siklus redox oleh alloxan dan asam dialurik. Kemudian terbentuklah radikal hidroksil yang menyebabkan rusaknya sel (Astarika, 2011). Stres oksidatif dalam tubuh disebabkan oleh adanya radikal bebas yang dihasilkan oleh (ROS). Peningkatan ROS ini juga mengakibatkan terjadinya peningkatan MDA akibat proses peroksidasi lipid, sehingga MDA digunakan sebagai salah satu marker untuk mengetahui stres oksidatif (Shofia *et al.*, 2013). Stres oksidatif terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan yang kemudian berpotensi menimbulkan kerusakan sel (Elgaml and Hashish, 2014).

Peningkatan temperatur lingkungan disertai kelembaban yang tinggi melebihi kisaran zona suhu nyaman memicu peningkatan stres oksidatif, dimana akan terjadi serangan radikal bebas pada membran sel (Mushawwir dan Latipuddin, 2013). Radikal bebas menyebabkan gangguan metabolit dan gangguan sel berupa gangguan

fungsi DNA dan protein, sehingga menyebabkan mutasi atau sitotoksik dan perubahan laju aktivitas enzim (Kinanti, 2011). Radikal bebas dapat meningkatkan peroksidasi lipid yang kemudian akan mengalami dekomposisi menjadi malondialdehyde (MDA) dalam darah. Uji MDA dapat digunakan untuk mengukur peroksidasi yang terjadi pada membran lipid. Profil MDA dalam serum berfungsi sebagai sebuah penanda kerusakan seluler akibat radikal bebas (Inoue, 2001).

2.5 Histopatologi Trakea

Trakea merupakan saluran pernapasan bagian bawah. Trakea terletak mulai dari ujung bawah laring setinggi *vertebrae cervicalis* VI, berakhir pada angulus sterni *vertebrae thorachalis* V–VI, dan disini bercabang menjadi dua menjadi *broncus principalis dexter*. Disebelah lateral trakea terdapat *arteri carotis communis* dan lobus-lobus *glandulae thyroidea*. Inferior dari isthmus *glandulae thyroidea* terdapat *arcus venosus jugularis* dan *vena thyroidea inferior*. *Truncus brachiocephalicus* berhubungan dengan sisi kanan trakea di laring (**Gambar 2.2**) (Rivanda, 2015). Trakea adalah kelanjutan jalan udara setelah laring tempat terjadi transpor udara pernafasan. Trakea berbentuk tabung (*windpipe*), meluas dari pangkal laring ke titik percabangan menjadi dua bronkus primer. Dinding trakea dilapisi oleh mukosa respirasi. Cincin tulang rawan hialin berbentuk C, dengan jumlah 16-20 yang terdapat dalam lamina propria berfungsi untuk menjaga agar lumen trakea tetap terbuka. Ujung terbuka dari cincin C terletak di permukaan posterior trakea (Anindyajati, 2007).



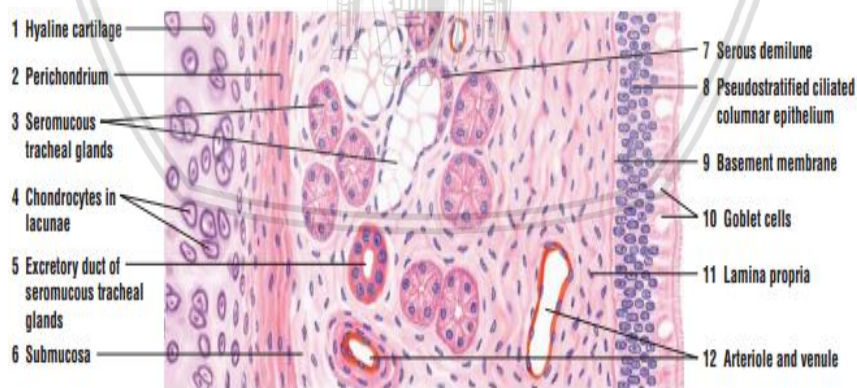
Gambar 2.2 Struktur Anatomi Trakea (Rivanda, 2015)

Menurut Eroschenko (2005), gambaran dari histologi trakea yaitu dinding trakhea (**Gambar 2.4**) terdiri dari mukosa, submukosa, kartilago hialin, dan adventitia. Trakea (**Gambar 2.3**) dikelilingi oleh cincin kartilago hialin yang berbentuk C. Kartilago hialin dikelilingi oleh jaringan ikat perikondrium yang menyatu dengan submukosa pada salah satu sisi dan adventitia di sisi lainnya. Banyak saraf, pembuluh darah dan jaringan lemak yang terletak di adventitia. Ruang pada kartilago hialin bagian posterior diisi dengan muskulus trakhealis. Muskulus trakhealis terletak pada jaringan ikat. Sebagian dari serat muskulus trakhealis masuk ke perikondrium yang menutupi ruang kartilago hialin. Lumen trakea dilapisi oleh epitel pseudotrafied kolumnar bersilia (**Gambar 2.5**) dengan sel goblet. Lamina propia mengandung serat jaringan ikat, difus jaringan limfatik, nodul limfatik yang

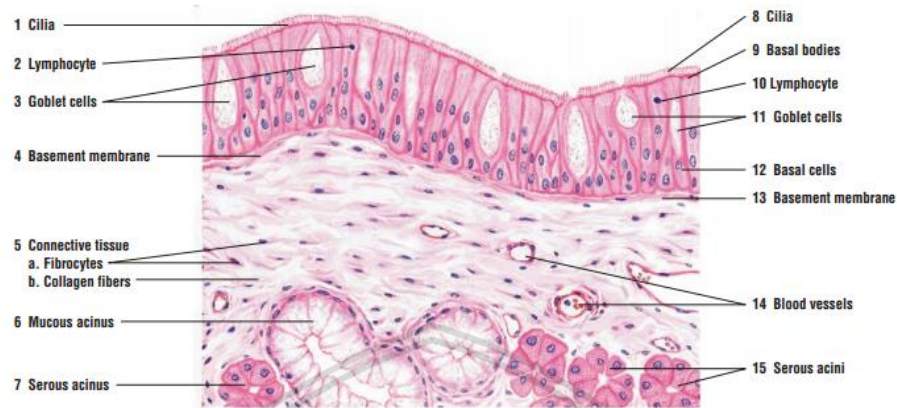
soliter. Di bawah lamina propia terdapat membran elastis longitudinal yang memisahkan lamina propia dari submukosa yang berisi jaringan ikat longgar. pada submukosa ditemukan kelenjar tubuloasinar seromukosa trakea yang mengekskretori kelenjar melewati lamina propia ke lumen trakea. pada mukosa terdapat lipatan mukosa sepanjang dinding posterior trakhea.



Gambar 2.3 Trakea dengan potongan melintang, pewarnaan hematoksilin eosin (HE) dengan perbesaran 100x (Eroschenko, 2005).

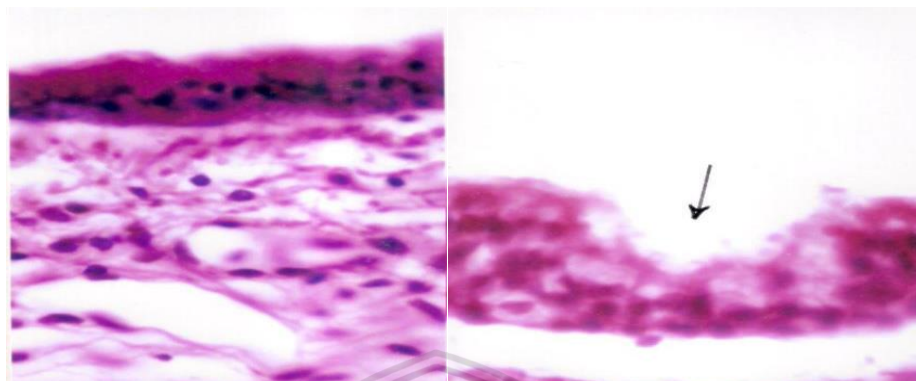


Gambar 2.4 Dinding trakea sectional view , pewarnaan HE, dengan perbesaran 400x (Eroschenko, 2005).



Gambar 2.5 Epitel pseudotrafied kolumnar bersilia pada trakhea, pewarnaan HE, dengan perbesaran 1000x (Eroschenko, 2005).

Paparan ovalbumin dan lipopolisakrida (LPS) pada tikus akan menyebabkan kerusakan epitel silindris bersilia menjadi tidak beraturan dan terjadi pelepasan epitel dari membran basalis. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Utomo (2012) bahwa LPS dari bakteri Gram negatif diketahui dapat menginduksi inflamasi pada saluran pernafasan sehingga mampu memperparah kondisi asma. Makhlof (2010) mengatakan bahwa dari hasil mengamati histopatologi organ trakea yang terkena asma dapat ditemukan beberapa sel epitel yang mengalami *desquamosa*, proliferasi yang berlebih, dan terjadi peningkatan jumlah sel goblet. Hal ini erat kaitannya dengan jumlah eosinofil yang dapat diamati pada sekitar jaringan trakea (**Gambar 2.6**).

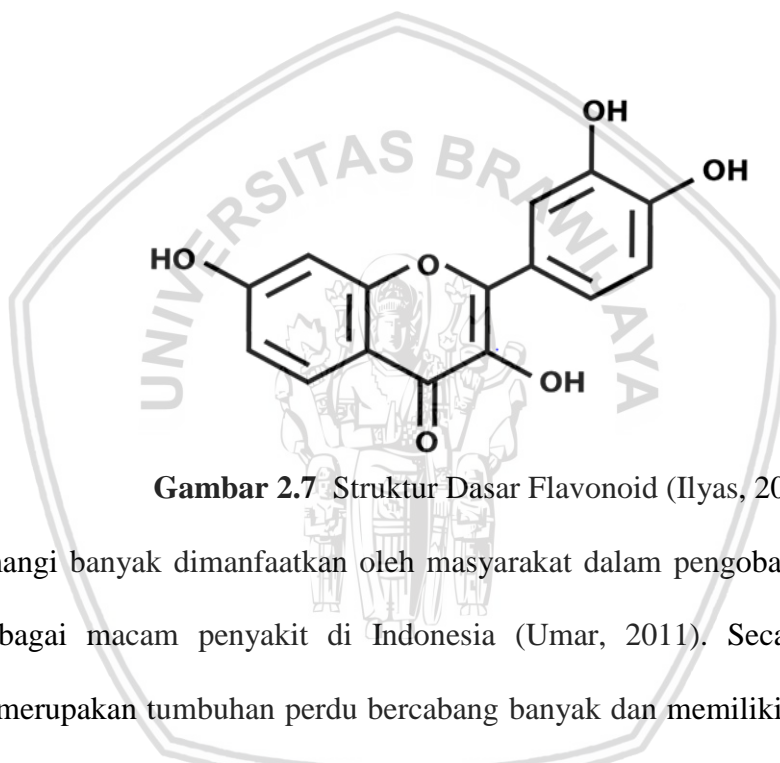


Gambar 2.6. Gambaran histologi dan histopatologi trakea. Gambaran histologi trakea normal dengan sel epitel *pseudo-columnair* (Kiri). Gambaran histopatologi trakea pada hewan asma, terjadi proliferasi sel epitel yang hilang kontinuitasnya (Kanan) (Makhlouf, 2010).

2.6 Kemangi (*Occimum cannum* Sims)

Kemangi (*Occimum cannum* Sims) merupakan tanaman yang banyak tumbuh di daerah tropis. Kemangi sangat populer di Indonesia. Di Jawa, Sumatra dan daerah lainnya daun kemangi sering dikonsumsi sebagai lalapan pelengkap makanan dan penguat aroma dalam makanan. Menurut Sarma *et al.* (2011) kemangi mengandung metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid, alkaloid, minyak atsiri. Hasil penapisan fitokimia ekstrak etanol 70% herba kemangi sendiri menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid/steroid (Medica *et al.*, 2004). Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya (Amalia, F., 2015; dan Nabila,

2017). Menurut Ilyas (2013) kerangka dasar flavonoid tersusun dari 15 atom karbon, struktur C₆-C₃-C₆ dari 15C ini membentuk model konfigurasi yang menghasilkan tiga macam model struktur dasar yaitu struktur 1,3-diarilpropana yang diistilahkan sebagai flavonoid, struktur 1,2-diarilpropana yang diistilahkan isoflavonoid dan struktur 1,1-diarilpropana yang diistilahkan neoflavonoid.



Gambar 2.7 Struktur Dasar Flavonoid (Ilyas, 2013)

Kemangi banyak dimanfaatkan oleh masyarakat dalam pengobatan tradisional untuk berbagai macam penyakit di Indonesia (Umar, 2011). Secara morfologi, kemangi merupakan tumbuhan perdu bercabang banyak dan memiliki tinggi 0,3-1,5 meter. Daun kemangi memiliki ciri-ciri yaitu merupakan daun tunggal, berbentuk bulat telur, ujung runcing, pangkal tumpul, pertulangan menyirip, panjang 14-16 mm, lebar 3-6 mm, memiliki tangkai daun yang panjang (sekitar 1 cm), dan berwarna hijau (Hadipoentyanti dan Wahyuni, 2008). Morfologi kemangi dapat dilihat pada **Gambar 2.8**.



Gambar 2.7 Kemangi (*Occimum cannum* Sims.)(Sarma *et al.* 2011)

Klasifikasi kemangi

Kingdom : Palntae

Divisi : Magnoliophyta

Subdivisi : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Lamiales

Famili : Lamiaceae

Genus : Ocimum

Spesies : *Ociumum cannum* Sims.

Hasil fitokimia menunjukan bahwa kemangi (*Occimum cannum* Sims) mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, steroid. Senyawa flavonoid dapat digunakan sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas didalam tubuh (Sarah, 2015). Antioksidan adalah suatu senyawa yang mampu meredam efek

oksidan dengan cara memberikan elektron pada radikal bebas (ROS), sehingga akan membentuk senyawa yang lebih stabil (Danuantoso, 2003).

2.7 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Hewan percobaan yang umum digunakan dalam penelitian ilmiah adalah tikus putih. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara baik, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang adaptif serta cocok untuk berbagai penelitian. Tikus yang digunakan sebagai hewan model asma adalah *Rattus norvegicus* jantan strain Wistar, umur 10-12 minggu, sehat, berat badan 150-200 gram. Pengembangan hewan model untuk penyakit alergi seperti asma, rinitis, alergi makanan telah banyak dilakukan pada tikus (Nials *et al.*, 2008). Penggunaan tikus sebagai hewan model asma dikarenakan tikus memiliki beberapa keunggulan yaitu produksi IgE yang merupakan antibodi anafilaksis (hipersensitivitas terhadap antigen) terbesar. Selain itu tikus memiliki kemampuan untuk mengalami *airway hipereaktivitas* yang lebih lama (Zosky and Sly, 2007).

Klasifikasi tikus menurut (Armitage, 2004) yaitu :

Kingdom	: Animalia
Divisi	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae

Genus : *Rattus*

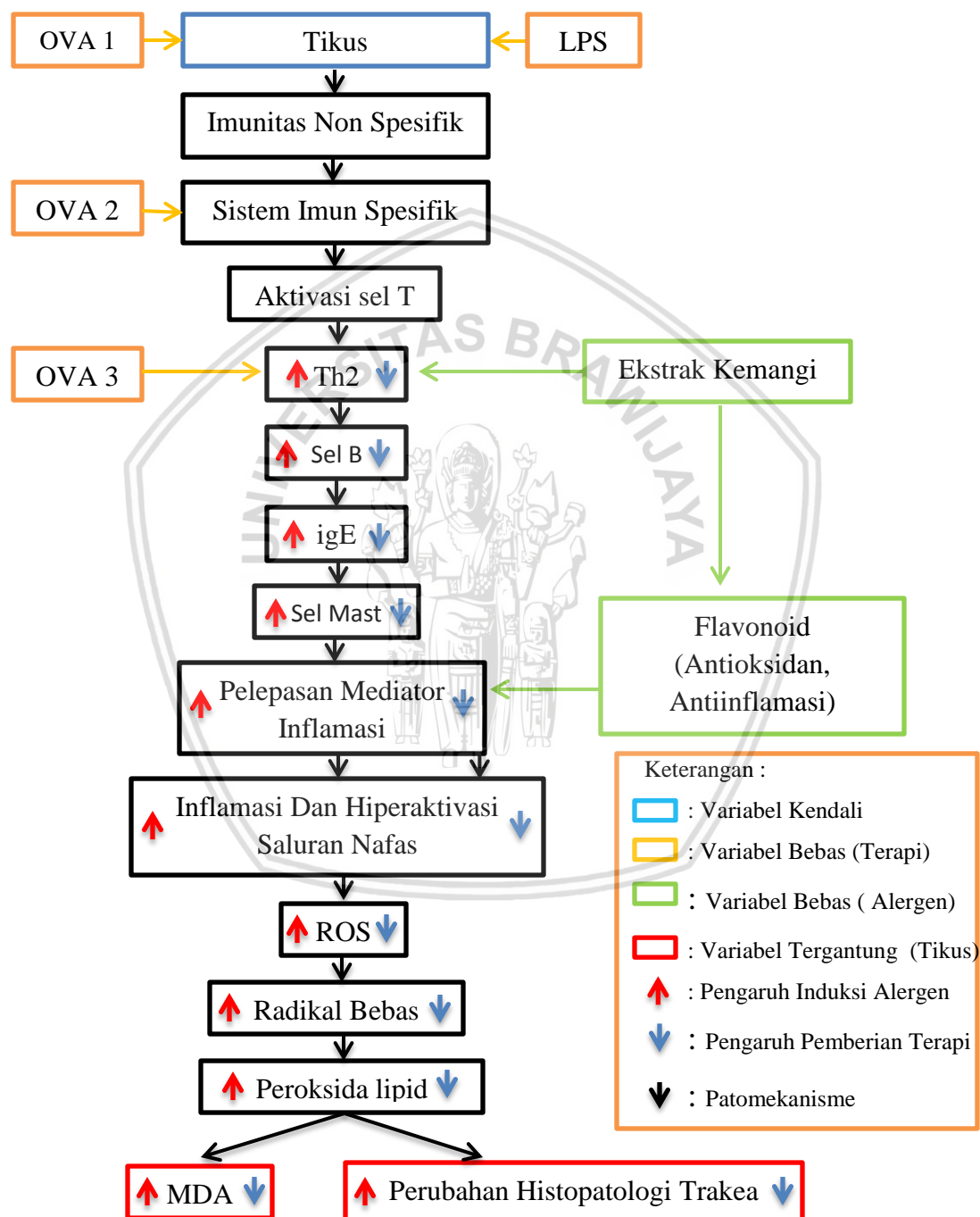
Spesies : *Rattus norvegicus L.*

Strain : *Wistar*



BAB 3 KERANGKA TEORI

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1. Kerangka Teori

Alergen yang digunakan pada penelitian ini adalah ovalbumin dan lipopolisakarida. Pemberian ovalbumin pertama secara intraperitoneal bertujuan membentuk sistem imun non-spesifik untuk mengenali, mengolah dan mempresentasikan antigen ke sel T. Sistem imun nonspesifik terdapat sel dendritik yang berfungsi untuk mengaktivasi reaksi presentasi antigen sehingga mengeluarkan sitokin proinflamasi yang kemudian menginduksi mediator inflamasi ke daerah inflamasi. Pemberian Lipopolisakarida secara intrasulkuler sebelum pemberian ovalbumin kedua berfungsi untuk mengikat dinding sel saluran pernafasan dengan Lipopolisakarida tersebut melalui bantuan LPB, sehingga LPS dapat dikenali oleh CD14 kemudian melawati TLR4 untuk dikenali oleh sel dendritik. Pemberian ovalbumin kedua secara intraperitoneal berfungsi untuk mengaktifkan sistem imun spesifik, sedangkan pemberian ovalbumin ketiga secara inhalasi berfungsi untuk mengaktifkan Th2 di saluran pernafasan. Th2 akan mengaktivasi sel B untuk memproduksi IgE yang diikat silang oleh FcεR1 pada permukaan sel mast yang memicu pelepasan histamin. Histamin memicu vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskuler, kontraksi otot polos, dan peningkatan sekresi lender.

Kemudian IgE akan berikatan dengan reseptor Fc pada sel mast dan menghasilkan pelepasan mediator inflamasi seperti histamin, prostaglandin, leukotrin dan sitokin yang memicu terjadinya fase inflamasi, adanya asam arakidonat (AA) yang dimetabolisme melalui jalur siklooksigenase (COX) akan menghasilkan prostaglandin (PGD₂, PGE₂, PGF_{2a}) yang menyebabkan bronkokonstriksi, vasodilatasi dan meningkatkan permeabilitas vaskuler, sedangkan AA yang

dimetabolisme melalui jalur lipooksigenase (LO) akan menghasilkan leukotrin (LTA₄) sebagai bronkokonstriksi kuat yang meningkatkan pembentukan edema dan merupakan kemotaktik untuk eosinofil.

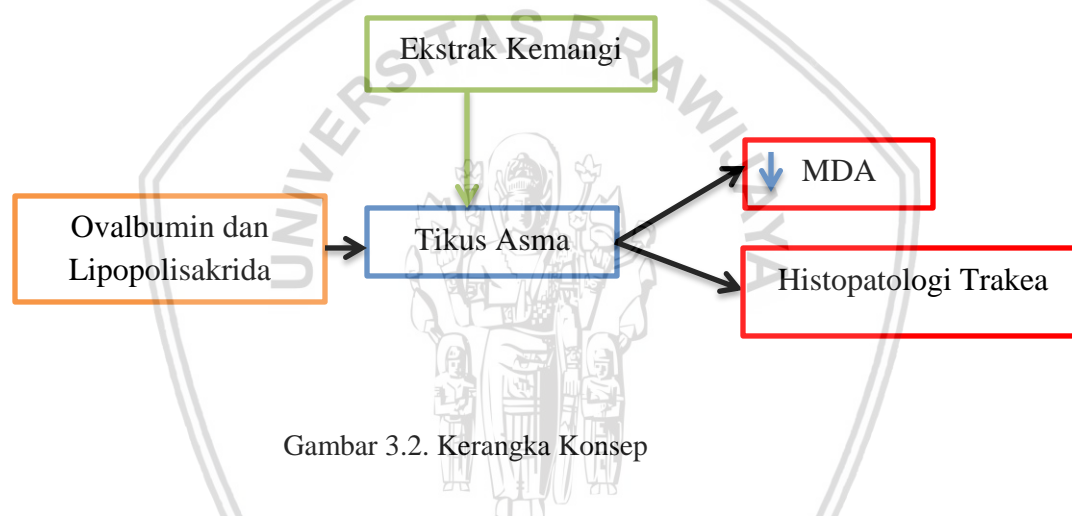
Lepasnya mediator inflamasi mengakibatkan terjadinya kontraksi otot polos saluran napas, edema, peningkatan sekresi mukus sehingga terjadi sumbatan jalan napas dan inflamasi pada saluran pernafasan

Paparaan Lipopolisakarida menyebabkan aktivasi sel-sel inflamatori seperti eosinofil, makrofag dan sel mast yang mampu melepaskan mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien dan sitokin serta menghasilkan oksigen reaktif (ROS). Oksigen reaktif yang terlepas menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif. Radikal bebas akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh (PUFA) penyusun membran sel untuk mencapai keseimbangan atau disebut sebagai proses peroksidasi lipid yang menghasilkan produk aldehida berupa MDA. Sel inflamatori yang teraktivasi pada kondisi asma menyebabkan peningkatan enzim proteolitik, sehingga mampu menyebabkan kerusakan sel epitel yang mempengaruhi perubahan histologi trakea.

Pemberian terapi dengan ekstrak kemangi mengandung senyawa flavanoid yang memiliki fungsi sebagai antioksidan, dan anti-inflamasi. Flavonoid berfungsi sebagai *scavenger* radikal bebas. Flavonoid akan beraksi dengan radikal bebas melalui donor protonnya sehingga menjadi senyawa yang tidak reaktif dan stabil. Penurunan radikal bebas oleh flavonoid akan mencegah reaksi radikal berantai yang dapat merusak protein dan struktur jaringan saluran pernafasan. Flavonoid akan

menstabilkan radikal bebas sehingga menghambat proses peroksidasi lipid dan menurunkan kadar MDA dalam darah. Flavonoid dapat menghambat sitokin pro-inflamasi, menyebabkan aktivitas enzim proteolitik berkurang sehingga kerusakan epitel juga berkurang. Kondisi ini dapat dilihat dari perbaikan gambaran histopatologi trakea.

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis Penelitian

Dari kerangka konsep penelitian, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) dapat menurunkan kadar MDA darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.

2. Pemberian ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) dapat memperbaiki gambaran histopatologi trakea pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan November-Desember 2017 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya digunakan sebagai tempat pemeliharaan tikus (*Rattus norvegicus*), membuat ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims), pembacaan Malondialdehyde (MDA). Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya digunakan untuk mengamati preparat histopatologi trakea. Laboratorium Patologi Universitas Airlangga digunakan untuk membuat preparat pewarnaan HE.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar*, jantan, berat 150-200 gram, dan umur 8-12 minggu, LPS1435/1449 dari bakteri *Porphyromonas gingivalis*, ovalbumin (Sigma-Aldrich), NaCl Fisiologis, PBS, akuades, Tris-HCL (Biomedical), etanol 70%, alkohol 70%, kemangi, etanol, NaCl 0,9%, Na-Thio, HCL, TCA 10% *alkohol xylol*, *xylol* I, II, dan III, paraffin cair, serta pewarna hematoksilin dan eosin.

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan saat penelitian ini adalah bak pemeliharaan tikus putih (*Rattus norvegicus*), tempat makan dan minum tikus, timbangan, sentrifugator, jas laboratorium, kain untuk *handling* tikus putih (*Rattus norvegicus*), disposibek

syringe 1 mL, 3 mL, alat bedah, cawan petri, *Beaker glass*, *cover glass*, *Objeck glass*, pot organ, lemari pendingin, *Omron CompAir Compressor Nebulizer*, tisu, sarung tangan, glove, masker, *blander*, pisau scalpel, pinset, saringan, *tissue casset*, mesin prosessor otomatis, mesin vakum, mesin *blocking*, *freezer* (-20 °C), mesin microtom, pisau microtom, *waterbath* 46 °C, kaca obyek, kaca penutup, rak khusus untuk pewarnaan, oven 60°C, timbangan, tabung erlenmayer, spektrofotometer, vortex, dan mikroskop Olympus BX51.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Wistar*, jantan, berat 150-200 gram dan umur 8-12 minggu yang didapatkan di Laboratorium Farmakologi Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang bersifat eksperimental laboratorik dengan membagi subyek menjadi lima kelompok secara acak. Setiap kelompok terdiri dari empat tikus putih (*Rattus norvegicus*). Kelompok A adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) sehat sebagai kontrol negatif, kelompok B adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Ovalbumin dan Lipopolisakarida sebagai kontrol positif, sedangkan kelompok C, D, E sebagai kelompok terapi adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi Ovalbumin

dan Lipopolisakarida, serta diterapi estrak kemangi (*Occimum cannum*Sims) dengan dosis masing-masing sebesar 0,6 g/ kgBB, 0,9 g/kgBB, dan 1,2 g/kgBB.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

VARIABEL YANG DIAMATI	ULANGAN			
KADAR MDA DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TRAKEA	1	2	3	4
Kelompok A (Kontrol Negatif)				
Kelompok B (Kontrol Positif)				
Kelompok C (Terapi dosis 0,6 g/kg BB Asma + Terapi)				
Kelompok D (Terapi 0,9 g/kg BB Asma + Dosis Terapi)				
Kelompok E (Terapi 1,2 g/kg BB Asma + Dosis Terapi)				

Tabel 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian

Penggunaan besaran sampel dapat digunakan rumus frederer (Kusriningrum, 2008) :

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/5$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas, untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok, jadi total tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel penelitian yang diamati, yaitu :

- Variabel bebas : Dosis ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims), Ovalbumin dan Lipopolisakarida
- Variabel tergantung : Kadar MDA Serum dan Gambaran Hisopatologi trakea
- Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*), (strain, jenis kelamin, umur, berat badan), lingkungan, suhu, dan pakan.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diaklimasi terhadap lingkungan selama tujuh hari dengan pemberian makanan berupa ransum basah berisikan protein (20%), serat (5%), dan lemak (5-10%). Pakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) berbentuk pelet dan diberikan dua kali sehari. Air minum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberikan secara adlibitum. Tikus dikandangkan pada kandang yang berukuran 17,5x 23,75x 17,5 cm, dengan jumlah 4 ekor untuk setiap bahan. Kandang terbuat dari plastik. Kandang berlokasi jauh dari suara yang rebut, bebas dari asap serta bebas polutan. Alas kandang mudah dibersihkan.

4.6.2 Hewan Model Asma

Induksi Ovalbumin dan Lipopolisakarida dapat memicu respon imun. Pemberian ovalbumin dilakukan tiga kali. Ovalbumin I diinjeksikan intraperitoneal pada hari ke 0 dihitung setelah dilakukan aklimatisasi hewan coba, OVA II diinjeksikan intraperitoneal lagi pada hari ke 14 dan Ovalbumin III diberikan secara inhalasi menggunakan tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron Compare Compressor Nebulizer* pada hari ke 21. Injeksi Lipopolisakarida intrasulkuler pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus selama 2 hari pada hari ke 10 dan 11 (Utomo, 2012). (**Lampiran 2**).

4.6.3 Pembuatan Estrak Kemangi (*Occimum cannum Sims*)

Menurut Restiyani dkk., (2015) Ekstraksi memiliki tujuan, yaitu penarikan senyawa metabolit sekunder dari bahan yang digunakan yang memiliki aktivitas farmakologi. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan remaserasi 24 jam. Simplisia yang dilakukan, yaitu 1 kg serbuk simplisia daun kemangi dengan pelarut etanol 70%. Selanjutnya hasil ekstraksi dievaporasi dengan suhu 40°C dimana merupakan suhu dibawah titik didih etanol, bertujuan agar komponen dalam senyawa terlarut tidak rusak terutama komponen yang kurang stabil terhadap suhu yang tinggi. Ekstraksi pekat selajutnya diuapkan diatas penangas air hingga cair. Analisa kualitatif uji flavonoid sebanyak 0.1 g ekstrak ditambahkan 10 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtrat digunakan untuk pengujian. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0.5 g serbuk Mg, 1 mL

HCl, dan 1 mL amil alkohol, kemudian dikocok kuat. Uji positif flavonoid menghasilkan warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

4.6.4 Pemberian Terapi Estrak Kemangi (*Occimum cannum* Sims)

Pemberian terapi dimulai pada hari ke-22. Terapi kemangi (*Occimum cannum* Sims) diberikan pada kelompok C, D, dan kelompok E. Pemberian terapi dilakukan peroral menggunakan sonde lambung dengan dosis ekstrak daun kemangi yang berbeda pada ketiga kelompok tersebut yaitu 0,6 g/kgBB; 0,9 g/kgBB; dan 1,2 g/kgBB. Pemberian terapi dilakukan satu kali per hari selama 14 hari

4.6.5 Pengambilan Sampel Serum

Sebelum dilakukan pengambilan serum, terlebih dahulu tikus putih (*Rattus norvegicus*) dianastesi umum menggunakan ketamin 1%. Kemudian, dilakukan pembedahan thoraks untuk mengambil darah pada jantung menggunakan disposable syringe 5 mL. Prosedur pembedahan tikus menurut Leary dkk., (2013) dilakukan pembedahan thorak untuk mengambil darah sekitar 3ml dari bagian jantung dengan menggunakan alat suntik, kemudian langsung dimasukan ke dalam tabung vacuum venojact. Darah yang telah diambil ditampung dalam tabung venojact tanpa EDTA kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang terbentuk terletak pada bagian atas, dipisahkan, dan diambil untuk dianalisa dengan metode spektrofotometri.

4.6.6 Penentuan Larutan Kurva Standar Malondialdehyde (MDA)

Sebanyak 100 μL stok kit MDA konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mL ditambahkan 550 μL *aquadest* dan 100 μL TCA 10% serta 100 μL Na-Thio 1% di homogenkan. Kemudian, disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan diinkubasi pada suhu 100°C selama 30 menit dan diukur adsorbansi dengan menggunakan spektrofotometer dengan gelombang maksimum (533nm). Absorbansi dibuat regresi linear, sehingga di dapat persamaan kurva baku (Latifa, 2015).

4.6.7 Pengukuran Kadar Malondialdehyde (MDA) Serum

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode TBA dimulai dengan mengambil sampel serum sebanyak 500 μL , ditambahkan 500 μL NaCl fisiologis 0,9%, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil 100 μL dimasukkan ke dalam *microtube*, ditambah 550 μL *aquadest*, 100 μL TCA, kemudian dihomogenkan dengan vortex, ditambahkan 200 μL HCL 1N dan dihomogenkan kembali dengan vortex. Ditambahkan dengan 100 μL Na-Thio 1% dan dihomogenkan kembali dengan vortex. Selanjutnya, diinkubasi dengan suhu 100°C , setelah diinkubasi didinginkan pada suhu ruangan. Disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindah ke tabung rekasi baru. Sampel diukur absorbansi dengan spektrofotometri *Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1601* pada panjang gelombang maksimum (530 nm) (Zainuri dan Wanandi., 2012).

4.6.8 Pengambilan Trakea

Prosedur pembedahan tikus menurut Pratomo (2013)., tikus diposisikan dorsal recumbency dan difiksasi dengan jarum ke papan bedah pada semua telapak. Bedah dimulai dari ventral *midline abdomen*, dilakukan insisi kulit dan subkutan ke arah kranial, organ saluran pernafasan diambil dan pisahkan trakea, trakea dicuci dengan aquades hingga bersih. Kemudian trakea yang diambil dari bagian leher dimasukkan ke dalam larutan formalin 10%.

4.6.9 Pembuatan dan Pembacaan Preparat Histopatologi Trakea

Menurut Muntiha (2001), pembuatan preparat histopatologi membutuhkan bahan-bahan berupa potongan jaringan hewan yang telah difiksasi dengan *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10%, larutan, ethanol absolute, xylol, parafin, glyserin 99,5 %, albumin, larutan hematoksilin, lithium carbonat, larutan eosin, DPX, dan larutan dekalsifikasi (untuk jaringan tulang). Alat yang dibutuhkan adalah talenan, pisau scalpel, pinset, saringan, *tissue casset*, mesin processor otomatis, mesin vaccum, mesin bloking, freezer (-20 °C), mesin microtom, pisau microtom, water bath 46 °C, kaca obyek, kaca penutup, rak khusus untuk pewarnaan, oven 60°C.

Setelah jaringan organ yang berada di dalam larutan fiksatif matang, jaringan ditiriskan lalu dipotong menggunakan pisau scalpel dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun ke dalam *tissue cassette*, kemudian sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus. Keranjang yang berisi jaringan organ dimasukkan ke dalam mesin prosesor otomatis. Selanjutnya jaringan mengalami proses dehidrasi

bertahap dengan putaran waktu sebagai berikut : ethanol 70% (2 jam) ethanol 80% (2 jam) ethanol 90 % (2 jam) ethanol absolut (2 jam) ethanol absolut (2 jam) xylol (2 jam) a xylol (2 jam) parafin cair (2 jam) a parafin cair (2jam). Selanjutnya keranjang yang berisi *tissue cassette* dikeluarkan untuk dilakukan proses berikutnya (Muntiha, 2001).

Setelah proses dehidrasi dilakukan, kemudian dilanjutkan dengan penghilangan udara atau pross vakum dari jaringan dengan menggunakan mesin vakum yang di dalamnya terdapat tabung untuk menyimpan keranjang yang diisi parafin cair dengan temperatur (59 - 60° C) di vakum selama 30 menit. Keranjang diangkat, *tissue cassette* dikeluarkan dan disimpan pada temperatur 60° C untuk sementara waktu sebelum pencetakan dilakukan dengan parafin cair (Muntiha, 2001).

Mencetak blok paraffin diawali dengan menghangatkan cetakan dari bahan stainles steel di atas api Bunsen, lalu ke dalam setiap cetakan dimasukkan jaringan sambil diatur dan sedikit ditekan. Sementara itu ditempat lain disiapkan parafin cair dalam tempat khusus, sehingga dicapai suhu 60°C. Parafin cair tersebut dituangkan ke dalam jaringan sampai seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Selanjutnya blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan difrezer (-20) sebelum dilakukan pemotongan. Blok parafin yang mengandung jaringan, kemudian dipotong dengan menggunakan mesin mikrotom dengan ketebalan berkisar 3-4 pm. Potongan tersebut diletakkan secara hati-hati di atas permukaan air dalam waterbath bersuhu 46° C. Pada kesempatan ini bentuk irisan dirapikan, kemudian diletakkan di atas kaca obyek yang telah diolesi ewith,

yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca obyek dengan jaringan di atasnya disusun di dalam rak khusus dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C sampai preparat siap untuk diwarnai (Muntiha, 2001).

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus lalu dicelupkan secara berurutan ke dalam larutan dengan waktu sebagai berikut : xylol 3 menit, xylol 3 menit ethanol absolute 3 menit, ethanol absolute 3 menit, ethanol 90% 3 menit, ethanol 80% 3 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan hematoksin 6-7 menit, bilas dengan air keran 1 menit, larutan pembiru 1 menit, air keran 1 menit, larutan eosin 1 - 5 menit, bilas dengan air keran 1 menit, ethanol 80 % 10 celupan, ethanol 90 % 10 celupan, ethanol absolute 10 celupan, ethanol absolute 1 menit, xylol 3 menit, xylol 3 menit, xylol 3 menit. Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat, ditutup dengan kaca penutup dan diberi label. Kemudian diamati perubahan struktur epitel pada trakea menggunakan mikroskop Olympus dengan perbesaran 40x (Muntiha, 2001).

4.6.9 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu menggunakan analisis kuantitatif dan deskriptif. Analisis kuantitatif untuk kadar MDA menggunakan uji TBA dan SPSS (*Statistical package social science*) versi 22.0, uji analisis dengan One Way (ANOVA) untuk melihat pengaruh pemberian terapi, kemudian dilanjutkan dengan uji tukey untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap

perlakuan. Analisis deskriptif untuk pengamatan histopatologi trakea yang dilihat perubahan struktur epitel yang dibandingkan dengan histologi trakea.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Terapi Ekstrak Kemangi (*Occimum cannum* Sims) Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Serum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Asma Induksi Ovalbumin Dan Lipopolisakarida

Pada penelitian ini digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar, jantan sebagai hewan coba yang digunakan untuk membuat tikus model asma yang diperparah dengan pemaparan lipopolisakarida. Hewan model asma dibuat dengan memberikan alergen ovalbumin 10 µg yang diemulsikan dengan 1,5 mg ALOH3 dalam 200 µL PBS, kemudian diperparah dengan pemberian lipopolisakarida yang berasal dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* (dengan dosis 1 µg/mL).

Pemberian lipopolisakarida secara intrasulkuler bertujuan untuk menciptakan kondisi gingivitis, sehingga mampu memperparah keadaan asma yang ditandai dengan peningkatan MDA (Utomo, 2012). Menurut Amin (2009), pemberian lipopolisakarida dengan dosis 1 µg/mL pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma tersebut merupakan dosis optimum yang menyebabkan terjadi keparahan kerusakan jaringan pada organ pernafasan. Pemberian alergen secara intraperitoneal dan inhalasi bertujuan agar ovalbumin segera dikenali oleh APC yang banyak ditemukan pada cairan intra-peritoneal dan pada saluran pernafasan (Bratawidjaja, 2010). Selain itu, pemberian alergen berupa ovalbumin dapat membantu pembentukan fenotip Th-2 oleh sistem imun ketika terpapar antigen (Heriprasetya, 2007). Lipopolisakarida yang diinjeksikan intrasulkuler. Perbaikan kerusakan organ trakea pada penelitian ini diamati dengan pengukuran MDA. MDA merupakan hasil

dari peroksidase lipid akibat rusak membran sel oleh radikal bebas, MDA merupakan biomarker terjadi kerusakan sel. Penurun kadar MDA merupakan salah satu penanda terjadinya perbaikan organ (Eisenbarth dkk., 2002).

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar MDA, Standar Deviasi, dan Hasil Uji Tukey pada Serum Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kelompok Perlakuan	Rata-ratakadar MDA(ng/200µl)± SD
Kontrol negatif	0,117 ± 0,04 ^a
Kontrol positif	0,295 ± 0,07 ^c
Perlakuan 1	0,252 ± 0,02 ^{bc}
Perlakuan 2	0,192 ± 0,06 ^{abc}
Perlakuan 3	0,182± 0,03 ^{ab}

Keterangan : notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan ($p < 0,01$).

Rata-rata kadar MDA pada kelompok kontrol negative, yaitu 0,117 mg/µL dengan notasi a digunakan sebagai standar untuk menentukan kadar MDA normal pada tikus (*Rattus norvegicus*). Pada tikus (*Rattus norvegicus*) sehat kadar MDA akan tetap dihasilkan dalam kadar normal selama terjadinya biosintesis prostaglandin dalam sel (Repetto *et, al.*, 2012).

Pada kelompok kontrol positif menunjukkan kadar MDA, yaitu 0,295 mg/µL dengan notasi c yang menunjukkan bahwa kadar MDA yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif (**Tabel 5.1**). Peningkatan kadar MDA tersebut dikarenakan tinggi peroksidasi lipid yang secara tidak langsung menunjukkan tinggi kadar radikal bebas. Peningkatan kadar MDA diakibatkan oleh paparan ovalbumin dan lipopolisakarida yang berasal dari bakteri gram negatif *Phorphyromonas gingivalis*.

Paparan ovalbumin dan lipopolisakarida dapat mengaktifkan sel Th2 agar memproduksi sitokin proinflamasi. Hal tersebut merangsang proliferasi sel B menjadi sel plasma yang nanti akan memproduksi IgE. Ovalbumin dan lipopolisakarida didalam darah akan ditangkap oleh IgE, kemudian akan berikatan dengan sel mast melalui reseptor FcεR-1. Ikatan antara sel mast dan IgE akan memicu terjadi degranulasi sel mast dengan melepas mediator inflamasi berupa histamin, leukotrien, prostaglandin, dan sitokin proinflamasi yang menyebabkan terjadi inflamasi pada jaringan di saluran pernafasan dan menghasilkan radikal bebas, sehingga memicu terjadinya stres oksidatif (Heriprasetya, 2007). Mediator inflamasi, seperti histamin, sitokin dan leukotrien terakumulasi yang menyebabkan peningkatan ROS melebihi batas normal dan memicu peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid menghasilkan radikal bebas yang berinteraksi dengan PUFA dengan hasil akhir berupa MDA.

Pada penelitian ini pemaparan ovalbumin dan lipopolisakarida sebagai alergen dapat menyebabkan terjadi pelepasan radikal bebas molekul oksigen. ROS yang meningkat didalam jaringan dapat mengakibatkan terjadi stres oksidatif. Semakin tinggi kandungan ROS didalam jaringan berbanding lurus dengan tingginya stress oksidatif yang meningkatkan produk hasil berupa MDA sebagai penanda kerusakan seluler akibat radikal bebas (Strohmeier, 2001).

Pada kelompok perlakuan 1 didapatkan rata-rata kadar MDA, yaitu 0,2523 mg/μL dengan notasi bc yang menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok ini berbeda secara signifikan terhadap kelompok kontrol negatif, namun tidak berbeda secara signifikan terhadap kelompok positif.

Pada kelompok perlakuan 2 didapatkan rata-rata kadar MDA, yaitu 0,192 mg/ μ L dengan notasi abc yang menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok ini tidak berbeda secara signifikan terhadap kelompok kontrol negatif maupun positif.

Pada kelompok perlakuan 3 didapatkan rata-rata kadar MDA, yaitu 0,182 mg/ μ L dengan notasi ab yang menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok ini tidak berbeda secara signifikan terhadap kelompok negatif, namun berbeda secara signifikan dengan kelompok positif.

Penurunan kadar MDA tersebut dipengaruhi oleh aktivitas dari ekstrak kemangi yang mengandung flavonoid yang bertindak sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Flavonoid merupakan senyawa sekunder yang berperan sebagai senyawa antioksidan untuk mencegah radikal bebas didalam tubuh. Flavonoid menstabilkan senyawa oksigen reaktif dari radikal bebas sehingga mempengaruhi kondisi stress oksidatif yang ditandai dengan penurunan kadar MDA (Danuantoso, 2003). Kandungan flavonoid yang terdapat pada ekstrak kemangi juga bertindak sebagai antioksidan yang mampu menyeimbangkan radikal bebas yang dihasilkan pada proses pemaparan ovalbumin dan lipopolisakarida.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi sehingga mampu menetralkan radikal bebas (Widjaya, 2003). Pemberian ovalbumin dan lipopolisakarida pada penelitian ini akan meningkatkan kadar radikal bebas di dalam tubuh sehingga terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan endogen yang menyebabkan stres oksidatif. Oleh karena itu, tubuh memerlukan antioksidan

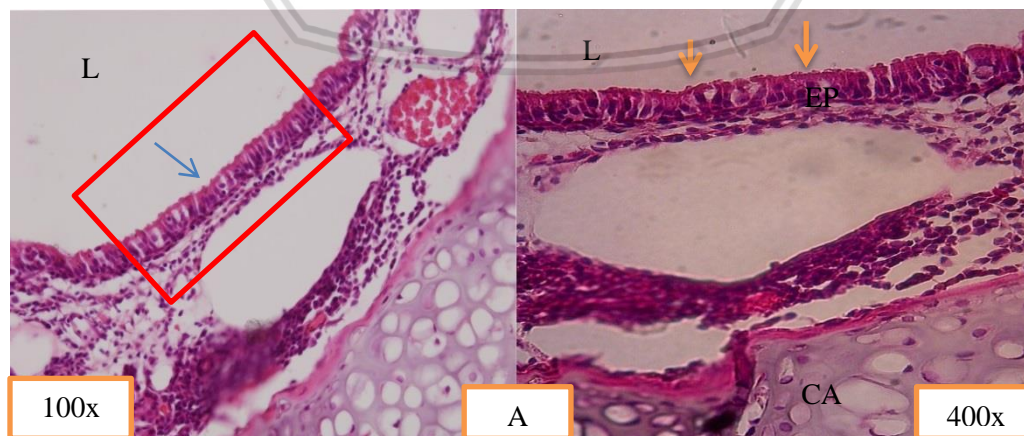
eksogen untuk menyeimbangkan kadar radikal bebas didalam tubuh, antara menggunakan ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims)

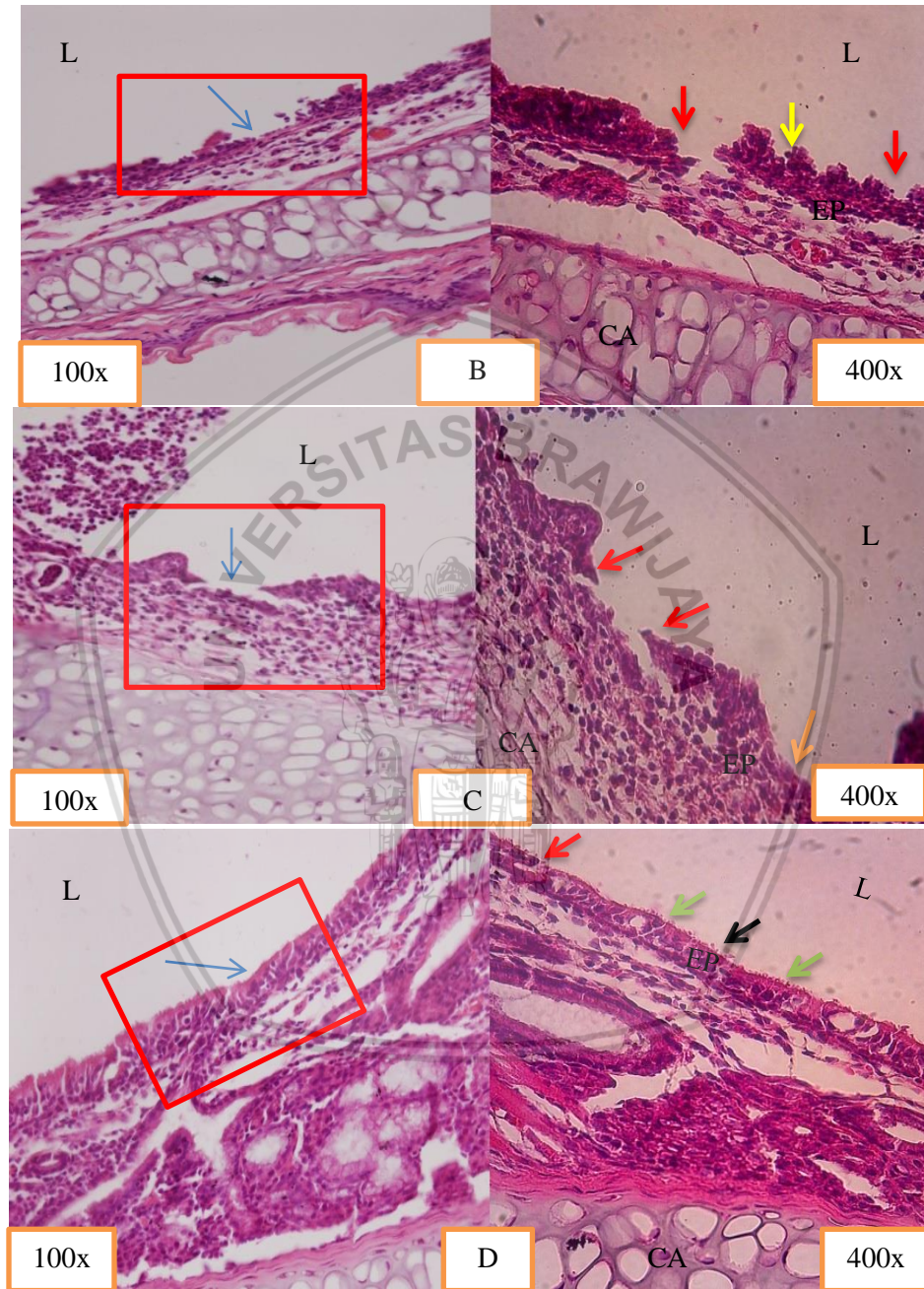
Flavonoid sebagai antiinflamasi menghambat proses terjadi inflamasi melalui dua cara, yaitu dengan menghambat permeabilitas kapiler dan menghambat metabolisme asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil dan sel endothelial (Kurniawati, 2005). Flavonoid berperan penting dalam menjaga permeabilitas serta meningkatkan resistensi pembuluh darah kapiler, oleh karena itu flavonoid digunakan pada keadaan patologis seperti terjadi gangguan permeabilitas dinding pembuluh darah. Terjadi kerusakan pembuluh darah kapiler akibat radang menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler yang akan keluar dari kapiler jaringan diikuti dengan terjadinya respon inflamasi. Flavonoid bekerja pada endothelium mikrovaskular untuk mengurangi terjadinya hipermeabilitas dan inflamasi. Kemudian, senyawa flavonoid dapat menghambat pelepasan asam arakhidonat dan sekresi enzim lisosom dari membran dengan cara memblok jalur siklooksigenase (Kurniawati, 2005). Penghambatan jalur siklooksigenase dapat menimbulkan pengaruh lebih luas karena reaksi siklooksigenase merupakan langkah pertama pada jalur yang menuju ke hormon eikosanoid seperti prostaglandin (PGE₂) dan leukotrien yang menyebabkan timbulnya reaksi inflamasi. Karena ada penekanan reaksi inflamasi dalam jaringan, maka akan menyebabkan penurunan reaksi stres oksidatif yang diakibatkan oleh inflamasi di saluran pernafasan, sehingga akan mempengaruhi terhadap penurunan kadar MDA.

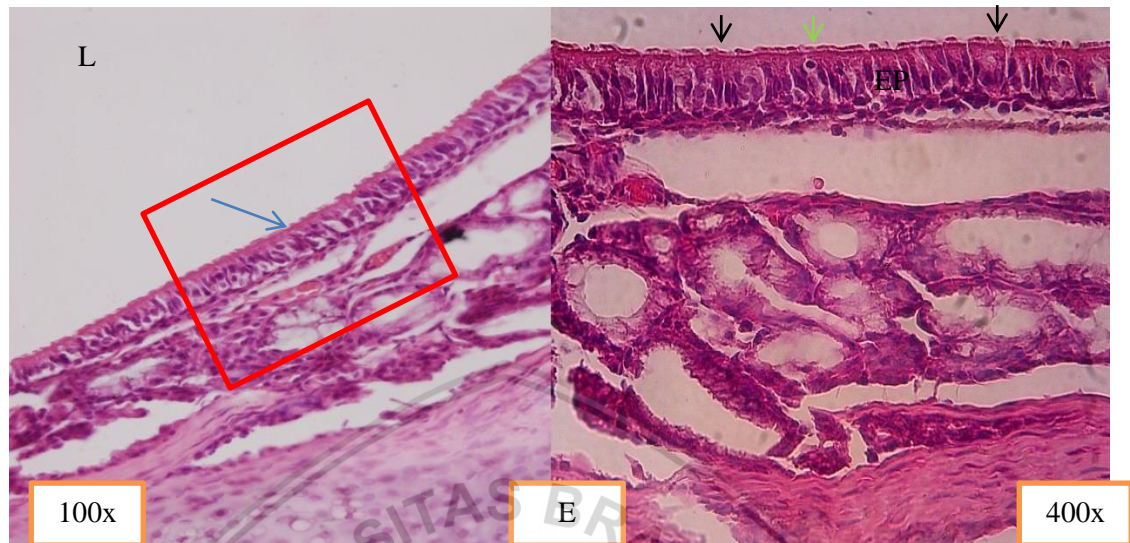
5.2 Efek Terapi Ekstrak Kemangi (*Occimum Cannum Sims*) Terhadap Gambaran Histopatologi Trakea Induksi Ovalbumin Dan Lipopolisakarida

Pengaruh terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum Sims*) terhadap asma diamati dengan pengamatan histopatologi epitel trakea menggunakan pewarnaan HE. Menurut Wadsworth dkk., (2012), epitel pada saluran pernafasan merupakan *barrier* pertama yang berinteraksi secara langsung terhadap paparan alergen, sehingga perubahan struktur pada epitel dapat digunakan sebagai indikasi ada paparan antigen pada saluran pernafasan. Kerusakan epitel berhubungan dengan reaksi inflamasi yang terjadi pada jaringan, sehingga pengamatan ini dapat dijadikan acuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan terapi yang dilakukan melalui gambaran perbaikan histopatologi trakea.

Preparat histopatologi yang diamati memperlihatkan gambaran struktur epitel trakea menjadi lebih jelas. Parameter histopatologi digunakan untuk menunjang hasil pengukuran kadar MDA serum.







Gambar 5.2. Gambaran Histopatologi Trakea Setelah Diterapi Ekstrak Kemangi (*Occimum cannum Sims*)

Keterangan: (A) Kontrol atau sehat (B) Asma atau sakit, (C) Asma dengan terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum Sims*) 0,6g/kg BB, Asma dengan terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum Sims*) 0,9g/kg BB, asma dengan terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum Sims*) 1,2g/kg BB. (↗) Epitel silindris *pseudostratified* dengan silia, (↗) struktur epitel yang rusak, (↗) epitel yang terlepas, (↗) perbaikan epitel, (L) lumen trakea, (C) kartilago hialin, (EP) epitel.

Gambaran histologi dari kelompok kontrol negatif (**Gambar 5A**) merupakan gambaran histologi trakea dari tikus normal. Gambaran histologi trakea pada tikus yang sehat akan terlihat struktur epitel silindris *pseudostratified* (semu bertingkat) dengan silia yang rapi yang menempel pada membran basalis (tidak ada epitel yang mengalami deskuamasi), sehingga tampak rapat dan kompak. Namun, tidak menutup kemungkinan juga ada sel yang mengalami kerusakan, meskipun dalam jumlah yang sedikit. Lauretta dkk., (2013), menyatakan bahwa kerusakan tersebut sebagai respon normal proses biokimia yang terjadi didalam tubuh, sehingga menimbulkan radikal

bebas endogen dan inflamasi. Kontrol negatif digunakan sebagai acuan untuk dibandingkan dengan perlakuan kelompok lain.

Hasil pengamatan histopatologi dari kelompok kontrol positif (**Gambar 5B**) menunjukkan gambaran histopatologi trakea yang mengalami kerusakan, ditandai dari gambaran sel-sel epitel yang mengalami perubahan struktur dari bentuk epitel silindris *pseudostratifieds* bersilia menjadi tidak beraturan dan terjadi pelepasan epitel dari membran basalis. Kerusakan epitel menunjukkan adanya kerusakan jaringan yang diakibatkan paparan antigen ovalbumin dan lipopolisakarida. Pada kondisi asma, seluruh saluran pernafasan akan mengalami perubahan struktur termasuk pada epitel trakea (Wadsworth dkk., 2012). Asma akan menyebabkan kerusakan epitel yang diakibatkan oleh antigen yang menempel pada lumen, sehingga memicu infiltrasi sel-sel inflamasi (Wang dkk., 2010).

Berdasarkan hasil penelitian dari Nials dan Uddin (2008), paparan antigen ovalbumin dan lipopolisakarida akan merangsang aktivasi sel inflamasi, makrofag, dan IgE didalam tubuh hewan model, sehingga dapat menimbulkan reaksi alergi. Peningkatan infiltrasi sel inflamasi akan menyebabkan mekanisme fagositosis terhadap antigen, sehingga memicu radikal bebas (Wang dan Ohura, 2002). Sel-sel yang teraktivasi akibat inflamasi akan memproduksi ROS dan enzim protease yang dihasilkan oleh neutrofil maupun makrofag, sehingga menyebabkan stres oksidatif (Ishmael, 2011).

Radikal bebas dalam tubuh yang dihasilkan selama proses inflamasi saluran pernafasan pada kondisi asma menyebabkan terjadi peroksidasi lipid sebagai akibat

dari ada stres oksidatif dalam tubuh. Salah satu produk aldehida yang dihasilkan dari proses peroksidasi lipid tersebut, yaitu MDA yang mampu merusak sel-sel saluran pernafasan salah satunya sel-sel epitel. Hal ini sesuai dengan yang dijelaskan oleh Sharma dkk. (2003) bahwa MDA dapat merusak sel karena produk tersebut mampu menaikkan permeabilitas vaskular, kemotaksis leukosit, dan mengubah sintesis prostaglandin serta pelepasan histamin yang menimbulkan inflamasi.

Hasil pengamatan histopatologi trakea pada kelompok C (Terapi 1) yang merupakan kelompok terapi dengan dosis ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) 0,6g/kgBB/hari (**Gambar 5C**) secara signifikan belum menunjukkan perbaikan pada gambaran histopatologi struktur dari epitel silindris *pseudotrafied* bersilia masih tidak beraturan.

Menurut Wadworth *et. al.*, (2012), epitel pada saluran pernafasan merupakan salah satu *barrier* yang berinteraksi secara langsung terhadap paparan benda asing, sehingga kerusakan pada epitel dapat digunakan sebagai indikasi paparan antigen pada saluran pernafasan yang berupa radikal bebas dari induksi ovalbumin dan lipopolisakarida. Hal ini terjadi karena radikal bebas yang berasal dari induksi ovalbumin dan lipopolisakarida belum dapat dihambat dengan dosis terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) tersebut. Senyawa ovalbumin terdiri dari 385 asam amino dengan massa molekul 45 kDa. Paparan kronik ovalbumin sebagai alergen akan menimbulkan perubahan struktur saluran nafas dan inflamasi (Huntington dan Stein, 2001). Lipopolisakarida akan menyebabkan kerusakan organ pernafasan, menginduksi produksi dan pelepasan sel inflamatori, seperti eosinofil,

neutrofil, monosit, makrofag dan sitokin. Sel-sel inflamasi yang teraktivasi akibat inflamasi menghasilkan oksidan reaktif, seperti ROS yang mampu menghasilkan senyawa radikal bebas dan enzim proteolitik. Radikal bebas mampu menyebabkan peroksidasi lipid pada membran biologis, sehingga menyebabkan kerusakan.

Gambaran histopatologi organ trakea kelompok D (Terapi 2) (**Gambar 5.2D**). dengan dosis ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) 0,9g/kg/BB/hari terlihat gambaran histopatologi trakea yang semakin membaik. Perbaikan sel ditandai dengan perbaikan struktur epitel dilihat dari berkurangnya jumlah sel epitel yang lepas dari membran basalis dan struktur epitel sudah kembali normal dengan bentuk silindris *pseudostratified*.

Gambaran histopatologi organ trakea kelompok E (Terapi 3) dengan dosis terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) 1,2g/kg/BB/hari memberikan gambaran histopatologi struktur epitel mengalami perbaikan yaitu struktur epitel menjadi lebih beraturan dan kompak serta tidak ditemukannya sel epitel yang lepas dari membran basalis.

Menurut Wardworth dkk., (2012) yang menyatakan bahwa pada saat epitel terlepas dari membran basalis, plasma dari endotel akan menuju ketempat kerusakan epitel dan menutup membran basalis. Plasma tersebut berfungsi sebagai mediator untuk reseptor yang menginduksi terjadi perbaikan sel epitel. Membran basalis yang terbuka akibat epitel yang terlepas akan tertutup oleh sel epitel dari sekitar kerusakan. Setelah itu, terjadi proses proliferasi dan diferensiasi untuk mengembalikan struktur dan fungsi epitel dengan *barrier* aktif. Tahap perbaikan dan remodeling epitel

tersebut dalam kondisi normal distimulasi dengan *growth factor*, sitokin, reseptor permukaan sel, molekul adhesi, dan sekresi mukus yang memodulasi fungsi protein dan lipid yang mengatur proses perbaikan epitel. Perbaikan kerusakan dipengaruhi oleh kandungan flavonoid pada ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) yang mampu mendonasikan atom hidrogen dari gugus hidroksil ($\cdot\text{OH}$) kepada radikal bebas ($\text{R}\cdot$), sehingga mengubah flavonoid menjadi radikal fenoksil flavonoid ($\text{FIO}\cdot$) yang memiliki elektron lebih stabil (Rahmah, 2012). Hal ini dikarenakan kandungan flavonoid pada ekstrak kemangi mampu menyeimbangkan radikal bebas yang terbentuk akibat induksi alergen. Menurut Rahma (2012), flavonoid akan meningkatkan aktivitas enzim SOD. Peningkatan aktivitas SOD dan radikal fenoksil flavonoid ($\text{FIO}\cdot$) akan menyeimbangkan radikal bebas, sehingga kerusakan sel akibat radikal bebas juga berkurang.

Kemangi (*Occimum cannum* Sim) mengandung flavonoid yang merupakan senyawa fenolik antiinflamasi, antioksidan, dan penangkap radikal bebas (Middleton dkk., 2000). Fungsi flavonoid sebagai penangkap radikal bebas akan menghambat aktivasi sel-sel inflamasi, sehingga tidak terjadi respon inflamasi. Radikal yang ditangkap oleh flavonoid akan menjadi senyawa yang stabil dan akan mengurangi jumlah senyawa radikal, sehingga dapat mempercepat proses perbaikan dan melindungi epitel dari kerusakan organ trakea agar tidak semakin parah. Sebagai antiinflamasi, flavonoid mampu menghambat aktivasi IL-4 dan IL-13 yang dilepas oleh sel Th2. Hal tersebut akan mengakibatkan sel B tidak memproduksi IgE, sehingga tidak terjadi pengaktifan sel mast. Tidak terjadi aktivasi sel mast dapat

menurunkan radikal bebas, sehingga memperbaiki organ trakea pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma. Dosis terapi yang terbaik dari penelitian ini adalah pada kelompok terapi 3 yaitu 1,2g/kg/BB/hari menunjukkan perubahan yang signifikan dan mendekati kelompok kontrol negatif, ditinjau dari perbaikan kerusakan struktur epitel trakea. Hasil tersebut juga didukung oleh perhitungan kadar MDA yang menurun pada kelompok E.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang akan dilakukan dapat diambil kesimpulan antara lain :

1. Pemberian terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma hasil paparan ovalbumin dan lipopolisakarida dengan dosis 0,6g/gBB/hari; 0,9g/kgBB/hari; dan 1,2g/kgBB/hari, dapat digunakan sebagai terapi model asma, didasarkan pada penurunan kadar MDA Serum dengan dosis optimum, yaitu 1,2g/kgBB/hari.
2. Pemberian terapi ekstrak kemangi (*Occimum cannum* Sims) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model asma hasil paparan ovalbumin dan lipopolisakarida dengan dosis 0,6g/gBB/hari; 0,9g/kgBB/hari; dan 1,2g/kgBB/hari, dapat digunakan sebagai terapi pada model asma, didasarkan pada perbaikan gambaran histopatologi trakea pada epitel, dengan dosis optimum, yaitu 1,2g/kgBB/hari.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan, yaitu, diperlukan kajian lebih lanjut untuk pemberian ekstrak Kemangi (*Ocimum cannum* Sims) untuk digunakan sebagai terapi asma pada hewan kesayangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, M. H. F., A.P.W. Mahendra., dan Aulanni'am. 2009. Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) Terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma. Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki Malang, 24-25 Juli 2009.
- Amalia, F. 2015. "The Effect of Honey in Diabetes Mellitus". *J Majority* 4, no. 2 (Jan 2015): h. 6-11.
- Agustina dan Ahmad. 2003. Antioksidan Penemuan Revolusioner Bagi Kesehatan. *Gizi Medik Indonesia*. 2 95): 4-6
- Armitage, D. 2004. *Rattus Norvegicus*. Animal Diversity Web Online.at: //animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Rattus_norvegicus/. [Diakses pada 10 Desember 2015]
- Astarika, A.G., 2011, Pengaruh Pemberian Madu terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Diabetes, *Skripsi UNISSULA*, Hal 50-58.
- Barlianto W, Kusuma MSC, Setyawati K, dan Karyonon M. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin, *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 25(1): 1-5.
- Barnes, P. J. 2011. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews* 242:31-50
- Bratawidjaja, K.G dan I, Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Bratawidjaja, K.G.dan I., Rengganis. 2013. *Imunologi Dasar Edisi 10*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Busse, W.W. and R.F. Lemanske. 2001. Asthma. *The New England Journal of Med* 344(5) : 350 362.
- Carey, S.A. 2011. Feline Asthma: A Pathophysiologic Basic of Therapy. *Michigan State University of Veterinary Medicine. USA*.
- Canonica GW. 2006. *Treating Asthma As An Infl Ammatory Disease*. Chest. 130: 88-218

- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2006. Biologi-Edisi Kelima-Jilid III. Addison
- Darveau, R.P., S, Arbabi., I, Garcia., B, Bainbridge., and R.V, Maier. 2002. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide is Both Agonist and Antagonist for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Journal: Infection and immunity* 70(4):1867
- Dorland. 2005. *Kamus Kedokteran*. Edisi 29. Jakarta: EGC
- Danusantoso, H. 2003. Peran Radikal Bebas Terhadap Beberapa Penyakit Paru. *Jurnal Kedokteran Trisakti*, 1(22):31-36
- Daniel G., Remick, M.D. 2007. Pathophysiology of Sepsis. *The American Journal of Pathology* Vol 120, No. 5, pp :1435-8
- Eisenbarth, S.C., D.A Piggott, J.W, Huleatt., I. Visitin, C.A Herrick., dan K. Bottomly. 2002. Lipopolysacchaide-enhanced, Toll-like Receptor4-dependent Thelper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *Jexp Med* 196 (12): 1645-1651.
- Elgaml, Shima. A., and Hashish, Emad. A., 2014, Clinicopathological studies of *Thymus vulgaris* Extract Against Cadmium Induced Hepatotoxicity in Albino Rats, *Global Journal of Pharmacology* 8 (4): 501-509
- Eroschenko, V.P. 2005. *Difiore's Atlas of Histology with Functional Correlations Eleventh Edition*. USA. Lippincott Williams & Wilkins.
- Fitriyani, atik et al., 2011. Uji Antiinflamsi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (Piper Crocatum Ruiz & Pav) Pada Tikus Putih. Fakultas Farmasi Universitas Jember. *Majalah Obat Tradisional*, 16(1), 34-42
- Foster, S.F, G.S. Allan, P, Martin, and I.D. Robertson. 2004. Twenty five asthma syndrom (1995-2000). *Journal of feline medical and surgery*, 6(3):181-188
- Gennaro, A.R. 2002. *Remington : The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition. New York: Lippincott Wiliams and Wilkins.

- Guilemany, J.M., Ferrer J.R., and Mullol J. 2008. *Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis and Nasal Polyposis*. In: Current Allergy and Asthma Reports. Current Medicine Group LLC Spain; 8:219–226.
- Graha, C.2008. *Terapi Untuk Anak Asma*. Jakarta. Elex Media Komputindo.
- Hadipoentyanti, E & Wahyuni, S. (2008). Keragaman Selasih (*Ocimum spp*) Berdasarkan Karakter Morfologi, Produksi dan Mutu Herba. Jurnal Littri. ISSN : 085388212. 14(4):141-148
- Heriprasetya D. 2007. Efek Pemaparan Ovalbumin Aerosol Terhadap Eosinofilia Bronkus pada Mencit Balb/C. Nexus Medicus, J Ilmiah Penelitian Medis.18(1): 8-15.
- Hidayati, 2008. Kandungan Kimia dan Uji Antiinflamsi Ekstrak Etanol Lantana Camara L. Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*.) Jantan. Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta.
- Huntingeston, J.A and P.E. Stein. 2001. Structure and Properties of *Ovalbumin*. *Journal of Chromatography*, B756 (1-2):189-198
- Ignatavicius, D. D., and Workman, m. L. 2010. *Medical - Surgical Nursing: Clients – Centered Collaborative Care*. Sixth Edition, 1 & 2 . Missouri: Saunders Elsevier.
- Ilyas, A. 2013. *Kimia Organik Bahan Alam*. Makassar: Alauddin-press, 2013.
- Iman, E.R.S, R. Ratih, E.N. Hasutji, Suryani dan T. Wiwiek. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner 1*. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (UAP): Surabaya.
- Inoue M. 2001. Protective mechanism against reactive oxygen species. In Arias IM The liver biologyand pathobiology L Jippincott Williams and Wilkins 4th-ed. Philadelphia.
- Ishmael, F. T. 2011. The Inflammatory Response in the Pathogenesis of Asthma. JAOA: Supplement 7 (The Whole Patient), 111(11) : S11-S17.
- Juwita, N. 2015. *Uji Efektivitas Antialergi Ekstrak Etanol Daun Nimba (Azadirachta indica A. Juss.) pada Mencit yang Diinduksi dengan Ovalbumin (Abstr)*. USU.

- Kumar R. K., Herbert C. and Foster P. S. 2008. The 'classical' ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets* 9, 485–494
- Kharisma, D. P. 2002. Potensi Aktivitas Antiagregasi Platelet Lalap-lalapan dan Pemanfaatannya pada Jeli Agar : Pohpohan (*Pilea trinervia*), Kemangi (*Ocinum americanum*), dan Daun Kemang (*Mangifera kemanga*). Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kinanti, A.S.2011. Pengaruh suplementasi vitamin E dan DL methionine dalam ransum terhadap performa ayam broiler pada kondisi cekaman panas. Skripsi. Departemen Ilmu Nutrisi dan Teknologi Pakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kurniawati, A. 2005. Uji Aktivitas Anti Inflamasi Ekstrak Metanol Graptophyllum griff pada Tikus Putih. Majalah Kedokteran Gigi Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional IV, 11-13 Agustus 2005: 167-170.
- Kuswantoro, B., Aulanni'am dan Oktaviane D. A. 2012. *Studi Paparan Lipopolisakarida pada Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma Terhadap Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Sel Epitel Bronkiolus* [Skripsi]. Universitas Brawijaya.
- Latifa, K.I. 2015. *Profil Kadar MDA (Malondialdehid) pada Tikus yang Dipberikan Ekstrak Herba Thymi (Thymus vulgaris L.)*. [Skripsi]. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta: Surakarta.
- Lauretta,Muhartono M.dan A. Wahyuni. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Mahkota Dewa terhadap Gambaran Histopatologi Paru Tikus Putih yang diinduksi 7,12-Dimethylbenz(α)anthrancene (DMBA). *Medical Journal of Lampung University*. 3 (3): 114-123.
- Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T. 2013. AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals. hlm. 30–48.
- Lewis, S.M., Heitkemper, M.M, Dirksen, S.R. (2007). Medical Surgical Nursing : Assesment and Management of Clinical Problem. Pennsylvania: W.B Saunders.
- Makhlouf, Noha A. dan Manal Shaaban Hafez. 2010. Histological Study on the Effect of Transfer of Sensitized Rat Spleen Cells on the Late Asthmatic Response. *Egypt Journal Histology* 33 (3): 508-519.

- Medica V, Ruslan W, Nawawi A. 2004. Telaah Fitokimia Herba Kemangi *Ocimum sanctum* L.). Fakultas Farmasi Institut Teknologi Bandung. Skripsi
- Middleton, E., C, Kandaswami., dan T.C, Theohaharides. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4): 673-751
- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin Dan Eosin (H&E)*. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti 2001.
- Mushawwir, A. dan Latipuddin, D. 2013. Biologi Sintesis Telur, perspektif Fisiologi, Biokimia dan Molekuler Produksi Telur. Penerbit Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Nabila, A.I . 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Sarang Lebah dan Madu Hutan dari Luwu Utara dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). UIN Alauddin Makassar. *Skripsi*.
- Nials, A.T., and S, Uddin. 2008. Mouse Models of Allergic Asthma: acute and Chronic Alergen Challenge. *Journal Dis Model Mech*, 1(4-5): 213-220.
- Pratomo, I. 2013. Prosedur Tetap Pembedahan Hewan Uji. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Rahmah, N. L ., Aulanni'am, dan Rosdiana A . 2012. The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowl Disease Therapy in *Rattus norvegicus*, *Journal of Life Sciences* 6, pp. 144-154.
- Repetto, M., J. semprine And A. Boveris. 2012. Lipid Peroxidation Chemical Mechanism, Niological Implication And Analytical Determination. Dalam Lipid peroxidation, Angel Catala (Ed), InTech, DOI: 10.5772/45943
- Rivanda, A. 2015. *Pengaruh Paparan Karbon Monoksida Terhadap Daya Konduksi Trakea*. Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung. Volume 4. Nomor 8.
- Rachmadian, O.D. 2011. *Pengaruh Ekstrak Etanol Propolis Terhadap Hitung Sel Mast Intestinal Pada Tikus Putih (Rattus norvegicus) Model Asma Alergi* [Skripsi]. Surakarta. Universitas Sebelas Maret.

- Reinero, C.R. 2013. Advance in the Doagnosis and Treatment of Feline Asthma. USA: University of Missouri Columbia. Western Veterinary Conference 2013.
- Rengganis I. 2008. Diagnosis dan Tatalaksana Asma Bronkial. Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. *Majalah Kedokteran Indonesia*, Vol. 58, No.11: 445-446.
- Restiyani, A.D., Yuniarni U., dan Hazar S. 2015. *Uji Aktivitas Anti Inflamasi Ekstrak Herba Kemangi (Ocimum Americanum L) Terhadap Jantan Wistar*. Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika Pengetahuan Alam, Universitas Bandung.
- Sarah SM dan Lamia A.M. 2015. *Estimation of The Phitochemical Constituens and Biological Activity of iraqi Ocimum sanctum L .extracts*. Int J Pharm Bio Sci 2015 Jan.; 6(1): (B) 999 – 1007
- Sarma D, Sai Koteswar and Babu, A. Venka Suresh. 2011. Pharmacognostic and Phytochemical Studies of *Ocimum mericanum*. *Jurnal of Chemical and Pharmaceutical Research*, Volume 3. Nomor 3. Hal 337-347
- Sari, C.Y.I. 2013. Inflamasi Alergi pada Asma. *CDK-207/* vol. 40 no. 8, th. 2013.
- Setianti A.2009. Perbedaan *Mortality Rate* Pada Mencit Balb/C Model Sepsis Paparan Lipopolisakarida Dengan *Cecal Inoculum*. Universitas sebelas maret. Surakarta
- Schwartz, D. A. 2002. The Genetics of Innate Immunity. *Chest Journal* 121 : 62S–68S.
- Sharma, A, S. Bansal, dan R.K. Nagpal. 2003. Lipid Peroxidation in Bronchial Asthma. *Indian Journal of Pediatrics* 70(9) : 715717.
- Smits, J. 2009. *Oral Health and the Connection to Respiratory Disease, 482 Oral Disease: Prevention and Management*. University of Michigan Dental Hygiene E-Learning Program. Michigan.
- Strohmeier, G. H., J.H Walsh., E.S Klings., H.W. Farber., W. W. Cruikshank., D.M Center., dan M.J Fenton, 2001. Lipopolysaccharide Binding Protein Potentiates Airway Reactivity in a Murine Model of Allergic Asthma. *Journal of Immunology* 166: 2063-2070.

- Sukaina. I. 2013. Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Herba Kemangi (*Ocimum Americanum* Linn) Terhadap Udem Pada Telapak Kaki Tikus Putih Jantan Yang Diiinduksi Karagen. Fakultas kedokteran dan ilmu kesehatan. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Sundaru, H. 2002. *Respons Imun Pada Asma Bronkial. Dalam: Naskah Lengkap Pit Ipd.* Alwi F, Setiati S, Kasjmir YI, Bawazier LA, Syam AF, Mansjoer A, Suprahoita, eds. Jakarta: Pusat Informasi dan Penerbitan Bagian IPD FKUI. p. 1-6.
- Sumarmi S., Guntur A.H., 2008. *Sepsis in Eldery.* Kumpulan Karya Ilmiah A. Guntur H. Surakarta : Sebelas Maret University Press, p: 143
- Shofia, V., Aulanni'am, Mahdi, C., 2013, Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum Prismaticum*) terhadap Kadar Malondialdehid dan Gambaran Histologi Jaringan Ginjal pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Diabetes Melitus Tipe 1, *Kimia. Studentjournal*, 1, pp. 119-125.
- Takashi, R and Tanaka, T. 2013. *Flavonoid and Asthma.* US national Library of Medicine, National Institut of Health. Jun 2013;5(6):2128-2143
- Umar, A.N.L. 2011. Perbandingan Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dengan Ketokonazol 2% dalam Menghambat Pertumbuhan *Candida* sp. pada Kandidiasis Vulvovaginalis. Semarang: Universitas Diponegoro. *Skripsi*.
- Utomo, H. 2006. *Management Of Oral Focal Infection In Patients With Asthmatic Symptoms.* Dent. J. (Maj. Ked. Gigi) 39(3) :120–125.
- Utomo, H. 2012. Rapid Relief Mechanism of Allergic Rhinitis after “Assited Drainage” Therapy. Dental Hospital, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya. *Journal of Dentistry Indonesia* 2012, 19(3) : 57-64.
- Wadsworth, S.J., S. J, Yang., and D.B, Dorscheid. 2012. IL-13, Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair. License InTech Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.
- Wang, Xiaoyuan and P.J. Quinn. 2010. *Lipopolysaccharide: Biosynthetic Patway and Structure Modification.* Progress in Lipid Research 49: 97–107.

- Wang dan Ohura. 2002. Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide Signaling in Gingival Fibroblasts CD14 and Toll-like Receptor. *Journal Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (13): 132.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan alami dan Radikal Bebas*. Kasinumedial:Yogyakarta
- Winarsi, H., 2010, Protein Kedelai dan Kecambah, Manfaatnya bagi Kesehatan, Cetakan I, Kanisius, Yogyakarta, hal 170-171.
- Widjaya, C.H.2003. Peran antioksidan terhadap Kesehatan Tubuh. *Healthy Choice*, Edisi IV.
- Zainuri, M. dan Wanandi, S.I. 2012. Aktivitas Spesifik Manganase Superoxide Dismutase (MnSOD) dan Katalase pada Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Sistemik: Hubungannya dengan Kerusakan Oksidatif. *Jurnal Media Litbang Kesehatan*, 22(2): 87-92
- Zosky,G.R, A.N. LarcombE, O.J. White, J.T. Burchell, and D.J. Turner. 2007. Ovalbumin sensitised rat are good model for airway hiperresponsiveness. *Clinical and Experimental Alergy*. 38:829-838. *Journal of Immunology* 179:5748-5749